

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo embriológico de la glándula submandibular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Luis Quirós Terrón**

Directores

José Vicente Sanz Casado  
José Ramón Mérida Velasco

**Madrid, 2016**



# DESARROLLO EMBRIOLÓGICO DE LA GLÁNDULA SUBMANDIBULAR

*Trabajo de investigación presentado por el Ldo.*

**Luis QUIRÓS TERRÓN**

*para optar al Grado de Doctor*

***Directores: Prof. Dr. José Vicente Sanz Casado  
Prof. José Ramón Mérida Velasco  
Departamento de Anatomía y Embriología Humanas***

*Madrid, octubre de 2015*

*A mis padres a quienes todo se lo debo.*

A los Directores de la Tesis, el Prof. Dr. José Vicente Sanz Casado al que considero más que un amigo y al que debo todo lo que soy en el ámbito universitario y el Prof. Dr. José Ramón Mérida Velasco, por su decisiva colaboración personal y científica durante los últimos cinco años, fruto de la cual es el presente trabajo. Con respecto a este último me gustaría destacar que a pesar de los múltiples problemas que ha tenido que afrontar en el último año, siempre ha podido encontrar un momento para ayudarme; y eso es algo que nunca olvidaré y por lo que le estaré eternamente agradecido.

A los demás componentes del claustro de profesores del departamento de Anatomía Humana y Embriología. Nunca podré agradecer lo suficiente el lujo que me han concedido al aprender y colaborar con ellos en la docencia universitaria, disfrutar de tantas jornadas en las salas de disección, en la magnífica embrioteca del departamento o en sus despachos, siempre de puertas abiertas para todo el que lo requiera.

Un recuerdo imborrable mantengo con mis compañeros, profesores asociados de Departamento, los Dres. Samuel Verdugo, Ángel Herrero, Juan Pozo, Emilio Calvo, José Luis Conejo, Ignacio de Lucas, Isabel Maestre, Juan Perfecto Tobío y Guadalupe Fernández, por haberme ayudado a poder dedicarle el tiempo necesario al estudio que presentamos.

A las secretarías del Departamento de Anatomía Humana II, D<sup>a</sup> Ana Álvarez por su eficaz gestión en todo trámite administrativo, y D<sup>a</sup> Montse Juanilla por su inestimable ayuda y paciencia en darle orden y cuerpo escrito al presente trabajo de investigación.

A los técnicos de Laboratorio, D<sup>a</sup> Araceli García, D<sup>a</sup> Purificación Chimeno y D. Jesús de la Calle por su infatigable colaboración en el procesado de las muestras y enseñarme con tanta paciencia el maravilloso mundo del laboratorio.

A los técnicos especialistas en Anatomía por su disposición, colaboración y buen humor convirtiendo el día a día en la sala de Anatomía en un acto riguroso a la vez que entretenido.

A mi novia, Carla, a mi familia y a mis amigos, por su paciencia y todo el inestimable tiempo que me han concedido para el buen desarrollo de este trabajo.

Índice	Página
<b>ABSTRACT</b>	9
<b>RESUMEN</b>	15
<b>INTRODUCCIÓN</b>	19
Histología de la glándula salivar submandibular	20
Desarrollo	22
Factores que influyen en la morfogénesis glandular	25
<i>Mesénquima</i>	25
<i>Lámina Basal</i>	30
<i>Inervación</i>	31
Desarrollo de la glándula submandibular en ratón y rata	32
<b>JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	35
Justificación	35
Hipótesis	36
Objetivos	37
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	38
1. <i>Desarrollo de la glándula submandibular en embriones humanos.</i>	38
2. <i>Desarrollo de la glándula submandibular en embriones de rata</i>	40
3. <i>Estudio inmunohistoquímico</i>	40
<b>RESULTADOS</b>	43
Embriones humanos	43
<i>Estadio 16</i>	43
<i>Estadio 17</i>	45
<i>Estadio 18</i>	49
<i>Estadio 19</i>	52
<i>Estadio 20</i>	53
<i>Estadio 21</i>	55
<i>Estadio 22</i>	55
<i>Estadio 23</i>	56
Especímenes rata	59
<i>E14</i>	59
<i>E15</i>	60
<i>E16-17</i>	63
<i>E18-19-20</i>	64
<b>DISCUSIÓN</b>	67
<b>CONCLUSIONES</b>	77
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	78

## Índice de figuras

Página

Figura 1.- Embrión humano Se 10 mm GL. Sección frontal. Hematoxilina-eosina.	43
Figura 2.- Aumento de la figura anterior.	43
Figura 3.- Embrión humano PH 11mm.GL. Sección frontal. Hematoxilina-eosina.	44
Figura 4.- Aumento de la figura 3.	44
Figura 5.- Embrión humano FAUS 6; 13,6 mm. GL. Sección frontal. Hematoxilina-eosina.	45
Figura 6.- Aumento de la figura 5.	45
Figura 7.- Embrión humano MTD, 12 mm. Hematoxilina-eosina. Sección frontal.	46
Figura 8.- Aumento de la figura 7.	46
Figura 9.- Embrión humano MTD, 12 mm. Hematoxilina-eosina. Sección frontal.	47
Figura 10.- Aumento de la figura 9.	47
Figura 11.- Aumento de la figura 9.	47
Figura 12.- Embrión humano GI-2, 12,5 mm. Sección frontal. Tricrómico.	48
Figura 13.- Aumento de la figura 12.	48
Figura 14.- Aumento de la figura 12.	48
Figura 15.- Embrión humano GI-2, 12,5 mm. Sección frontal. Hematoxilina-eosina.	48
Figura 16.- Aumento de la figura anterior.	49
Figura 17.- Embrión humano GV3, 15mm. Sección sagital. Hematoxilina-eosina.	49
Figura 18.- Aumento de la figura anterior.	49
Figura 19.- Embrión humano GV3, 15 mm. Sección sagital. Tricrómico.	50
Figura 20.- Aumento de la figura anterior.	50
Figura 21.- Embrión humano GV3, 15mm. Sección sagital. Tricrómico.	50
Figura 22.- Aumento de la figura anterior.	50
Figura 23.- Embrión humano NO, 15 mm. Sección frontal. Azán.	51
Figura 24.- Embrión humano CIV2, 16mm. Sección frontal. Azán.	52
Figura 25.- Ampliación de la figura anterior.	52
Figura 26.- Embrión humano CAS, 20 mm. Sección frontal. Hematoxilina-eosina.	53
Figura 27.- Aumento de la figura anterior.	53
Figura 28.- Embrión humano CAS, 20 mm. Sección frontal. Hematoxilina-eosina.	54
Figura 29.- Aumento de la figura anterior.	54
Figura 30.- Embrión humano CAS, 20 mm. Sección frontal. Hematoxilina-eosina.	54
Figura 31.- Embrión humano BOT, 21mm. Sección sagital. Hematoxilina-eosina.	54
Figura 32.- Embrión humano GI4, 26,5 mm. Sección frontal. Azán.	55
Figura 33.- Embrión humano PT10, 26mm. Sección frontal. Bielschowsky.	55
Figura 34.- Embrión humano PT10, 26 mm. Sección frontal. Bielschowsky. Corte frontal.	56
Figura 35.- Embrión humano GI4, 26,5 mm. Sección frontal. Azán. Región suprahioidea lateral.	56
Figura 36.- Embrión humano PT10, 26 mm. Sección frontal. Bielschowsky.	56

Figura 37.- Embrión humano BR, 28 mm. Sección frontal. Hematoxilina-eosina.	57
Figura 38.- Embrión humano BR, 28 mm. Sección frontal. Hematoxilina-eosina.	57
Figura 39.- Espécimen de rata E14. Sección frontal. Hematoxilina-eosina.	59
Figura 40.- Aumento de la figura anterior.	59
Figura 41.- Espécimen de rata E15. Sección frontal. Hematoxilina-eosina.	60
Figura 42.- Aumento de la figura anterior.	60
Figura 43.- Embrión de rata E15. Sección frontal.	61
Figura 44.- Aumento de la figura anterior.	61
Figura 45.- Embrión de rata E15. Sección frontal. Patrón de inmunoreactividad positiva para NHK-1.	62
Figura 46.- Aumento de la figura anterior.	62
Figura 47.- Embrión de rata E15. Sección frontal. Patrón de inmunoreactividad positivo para NHK-1.	62
Figura 48.- Aumento de la figura anterior.	62
Figura 49.- Embrión de rata E15. Sección frontal. Patrón de inmunoreactividad positivo para NF200.	63
Figura 50.- Embrión de rata E15. Sección frontal. Patrón de inmunoreactividad positivo para NF200.	63
Figura 51.- Embrión de rata E16. Sección frontal. Hematoxilina-eosina.	64
Figura 52.- Aumento de la figura anterior.	64
Figura 53.- Embrión de rata E16. Inmunoreacción positiva para NHK-1.	64
Figura 54.- Embrión de rata E18. Sección frontal. Hematoxilina-eosina.	65
Figura 55.- Embrión de rata E18. Sección frontal. Hematoxilina-eosina.	65
Figura 56.- Embrión de rata E18. Sección frontal.	66
Figura 57.- Embrión de rata E18. Sección frontal.	66



## Índice de figuras

Página

Tabla I: Origen de la glándula submandibular en humanos (condensación epitelial)	24
Tabla II: Momento aparición yema (invaginación)	24
Tabla III: Comienzo de la fase de ramificación	24
Tabla IV: Canalización o tunelación del conducto	24
Tabla V: Momento aparición cápsula	24
Tabla VI: calendario eventos en el desarrollo de la glándula en ratón según Jaskoll y Melnick, (1999). Según Denny y cols, (1997) en la rata estos eventos ocurren dos días después.	34
Tabla VII. Características morfológicas de los embriones humanos estudiados	39
Tabla VIII: Resumen de los eventos durante el desarrollo de la glándula en embriones humanos	58
Tabla IX: Resumen del desarrollo de la glándula en embriones de rata	66

**ABSTRACT****Introduction**

Submandibular salivary gland is a tubuloacinosal gland that is mixed in humans. Therefore, it can also be called seromucous. This gland occupies the side of the suprahyoid region between the mandible and mylohyoid muscle. From a macroscopic point of view, the excretory duct (Wharton) starts from the sublingual extension of the gland and finishes at the sublingual caruncle, located on either side of the lingual frenulum. The hypoglossal nerve, together with the lingual veins, is related to the deep surface of the gland. The lingual nerve and parasympathetic ganglia are related to the excretory duct of the gland.

Many authors have analyzed the development of the submandibular gland from different perspectives. These analyses indicate the origin of the gland, in humans, from a proliferation of the epithelium of the mouth floor at the paralingual medial groove level.

Most of them describe the emergence of the outline between the 6th-7th week of development, but with differences in the size of the embryo. The epithelial thickening invaginates in the underlying mesenchyme and initially forms a solid cord. After this phase of invagination, growth occurs to form distal branches that will result in the secretory acini of the gland. Finally, during morphogenesis of the gland begins to appear light in the ducts. The condensed mesenchyme surrounding the epithelium, will result in the capsule and stroma of the gland.

Glands in rodents are anatomically similar to those in humans, presenting a system of ducts and acini. The development of rodent gland begins in mouse embryos at 11.5-12 days; and 14 days in rats. The beginning is described as a thickening of the epithelium next to the tongue. During this development, similar events to those occurred in human embryos happen such as: invagination, 12.5 days; branching, 13.5 days and light in the ducts, 15.5 days.

It is well known that, as with other glandular structures, the development of salivary glands depends on a continuous series of epithelial-mesenchymal interactions.

Recent research has focused on the role of parasympathetic innervation in the submandibular gland development. They suggest that parasympathetic innervation maintains the population of epithelial progenitor cells in an undifferentiated state during salivary gland organogenesis. Some authors believe that it has a role in induction and control of glandular development. In this sense, it defines which portion of the invaginated epithelium will constitute the excretory duct and which part will give rise to the gland itself.

## **Objectives**

To study the development of the submandibular gland in human and rat embryos trying to establish a relationship between the two.

To study the expression of NF200 and anti NHK1 in rat embryos, which demonstrates that neural elements and mesenchyme derived from the neural crest.

To relate the results obtained in rat immunohistochemical techniques and descriptive morphology gland development in human embryos, trying to

## II ■ ABSTRACT

clarify the possible influences of nerve and mesenchyme in the submandibular gland development.

### **Materials and methods**

21 human embryos for a longer length (GL) between 10 and 28 mm, corresponding to the Carnegie stadiums (EC) 16-23. They were fixed with 10% neutral formalin and embedded in paraffin later as Peterfi technique. The histological sections were stained with different techniques (hematoxylin-eosin, azan, Masson trichrome and Bielchowsky).

Rat embryos (Wistar) of 14-19 days old (five specimens of each stage). The specimens were fixed in 4% paraformaldehyde and then were dehydrated and processed in paraffin. For immunohistochemical study, the following antibodies were used:

- Monoclonal antibody against neurofilament 200 kd molecular weight, developed in mice: 200 anti-NF, NE clone 14 (Sigma).
- Mouse IgG antibody conjugated PAP developed in goat (Sigma).
- NHK-1 monoclonal antibody (Becton & Dickinson, CA)
- Mouse IgM antibody conjugated with PAP (Chemicon)

The morpho descriptive study was performed using a Nikon Eclipse microscope DXM 1200, coupled to Pc Pentium IV..

### **Results**

Our study allows systematizing the development of the submandibular gland in humans in five stages:

1. Presumptive glandular or epithelial condensation stage (placode) (EC16).
2. Stage of epithelial polarization (EC17), invagination and innervation, and branch start (EC18).
3. Stage of invaginated epithelium organization (EC19).
4. Channeling excretory duct stage (EC 20-21).
5. Final topography stage (EC22).

For us, the submandibular gland develops from the presumptive area, located in the epithelial condensation (placode) at the paralingual medial groove, which is accompanied by an underlying mesenchymal condensation. In E14-15 rat embryos, mesenchyme shows positivity to NHK-1 suggesting a neurocrestal origin. The area of epithelial origin is marked during the EC17 in humans by a change in cell morphology that constitutes the cell nuclei polarization marking presumptive excretory orifice area.

During the EC18 epithelial ingrowth occurs. This process has two major elements; the first is the underlying mesenchyme may influence epithelial invagination by a process of epithelial mesenchymal interaction. In addition, due to the migratory characteristics of mesenchymal cells derived from the neural crest, the invaginated epithelium is driven into the submandibular parasympathetic ganglion complex annexed to the lingual nerve. During this stage, mesenchyme innervation was observed from the lingual ganglioneural complex, coinciding with the early branch. In rat embryos we have checked the positivity to NF200 HNK-1 of the mesenchymal cells, endorsing a possible origin from neural crest.

This process is of great importance, as it allows to define that part of the epithelial invagination that will be the duct, placed rostral or ventral from the ganglion; and that part that form the gland itself, which will be the one related to the ganglion and placed dorsally; until it reaches its final topography (EC22) guided by the mesenchyme..

## Discussion

Our results, in human specimens, are consistent with previous studies according to the processes occurring during the development of the gland, but differ on the time of appearance.

The condensed mesenchyme, underlying the epithelial placode at the paralingual medial groove level in rats from E15, shows positivity for NHK1, suggesting a neurocrestal origin; coinciding with the statement made by different authors.

## Conclusions

We have established five stages in the development of human submandibular gland:

1. Epithelial condensation or placode stage, Carnegie Stadium 16.
2. Epithelial polarization stage, Carnegie Stadium 17; invagination and branching, Carnegie Stadium 18.
3. Epithelial organization stage, Carnegie Stadium 19.
4. Light in the excretory duct stage, Carnegie Stadium 20-21.
5. Glandular final topography stage, Carnegie Stadium 22.

Epithelial placode marks the place that will occupy the sublingual salivary papilla.

The submandibular gland originates from the epithelium of the floor of the mouth that will result in the glandular parenchyma and duct, and the

mesenchyme of neurocrestal origin which will result in the capsule or glandular stroma.

Glandular relationships, during development, with the lingual ganglioneural complex (submandibular parasympathetic ganglion and lingual nerve), marks which portion of the epithelial invagination will be the gland itself and which part will be the excretory duct.

## RESUMEN

### Introducción

Numerosos autores han analizado el desarrollo de la glándula submandibular desde diferentes perspectivas. Estos análisis señalan su origen, en humanos, a partir de una proliferación del epitelio del suelo de la boca a nivel del surco paralingual medial, entre la 6<sup>o</sup>-7<sup>o</sup> semana. El engrosamiento epitelial se invagina en el mensénquima subyacente. Tras esta fase se produce un crecimiento hasta formar ramificaciones distales y aparece luz en los conductos.

El desarrollo en roedores se inicia en embriones de 11.5 días en ratón; y 14 días en rata. Durante el desarrollo se suceden acontecimientos similares al desarrollo en humanos.

Investigaciones recientes se han centrado en el papel de la inervación parasimpática en el desarrollo de la glándula submandibular.



## Objetivos

Estudiar el desarrollo de la glándula submandibular en embriones humanos y de rata tratando de establecer una relación entre ambos estadios del desarrollo.

Estudiar la expresión de anti NF200 y NHK1 en embriones de rata, que ponen en evidencia elementos nerviosos y el mesénquima derivado de la cresta neural.

Relacionar los hallazgos obtenidos con las técnicas inmunohistoquímicas en rata y la morfología descriptiva del desarrollo de la glándula en embriones humanos, tratando de aclarar las posibles influencias de los elementos nerviosos y mesénquima en el desarrollo de la glándula submandibular.

## Material y método

21 embriones humanos con una longitud mayor (GL) que abarcaba entre 10 y 28mm., fueron teñidas con diferentes técnicas (hematoxilina-eosina; azan, tricrómico de Masson y Bielchowsky).

Embriones de rata (Wistar) de 14 a 19 días de edad. Para el estudio inmunohistoquímico se usaron los siguientes anticuerpos:

- Anticuerpo monoclonal contra neurofilamento de peso molecular de 200 kd, desarrollado en ratón: anti-NF 200, clon NE 14 (Sigma).
- Anticuerpo contra IgG de ratón PAP conjugado desarrollado en cabra (Sigma).

- Anticuerpo monoclonal NHK-1 (Becton&Dickinson, CA).
- Anticuerpo contra IgM de ratón conjugado con PAP (Chemicon)

El estudio morfodescriptivo se realizó con un microscopio Nikon Eclipse DXM 1200, acoplado a Pc Pentium IV.

## **Resultados**

La glándula submandibular se desarrolla a partir de una condensación epitelial del surco paralingual medial, acompañada de una condensación mesenquimal subyacente. En embriones de rata del E14-15 hemos comprobado que el mesénquima demuestra positividad al NHK-1 y al NF200, lo cual sugiere un origen neurocrestal.

Las células mesenquimales derivadas de la cresta neural vehiculizan el epitelio invaginado hacia el complejo parasimpático del ganglio submandibular. Durante este estadio se observó la inervación del mesénquima a partir del complejo ganglioneural lingual.

## **Discusión**

Nuestros resultados, en especímenes humanos, coinciden con lo reflejado en estudios anteriores en lo referente a los procesos que ocurren durante el desarrollo, aunque diferimos en el momento de aparición de los mismos.

El mesénquima condensado subyacente a la placoda epitelial, muestra positividad para NHK1, lo que sugiere un origen neurocrestal; coincidiendo con lo expuesto por diferentes autores.

## Conclusiones

Hemos establecido 5 fases en el desarrollo de la glándula submandibular:

1. Fase de condensación epitelial o placoda.
2. Fase de polarización epitelial, invaginación y ramificación.
3. Fase de organización epitelial.
4. Fase de luz en el conducto excretor.
5. Fase de topografía glandular definitiva.

La placoda epitelial marca el lugar de la papila salival sublingual.

La glándula submandibular se origina a partir del epitelio del suelo de la boca que dará lugar al parénquima glandular y al conducto, y del mesénquima de origen neurocrestal que dará lugar a la cápsula o estroma glandular.

La relación del esbozo glandular durante su desarrollo con el complejo ganglioneural lingual (ganglio parasimpático submandibular y nervio lingual) marcará que porción de la invaginación epitelial será la glándula y cual el conducto excretor.

## INTRODUCCIÓN

La primera descripción de la glándula submandibular fue realizada por Thomas Wharton en 1656, en su obra "Adenografia, sive Glandularus totius corporis descriptio", cuyo capítulo XXI tituló "De Glandulis Maxillaribus" y en el que describe esta glándula dividiéndola en externa e interna. Tras su descripción el conducto excretor de la glándula lleva su nombre. A lo largo del tiempo ha recibido diferentes denominaciones, así Meckel (1820) fue el primero que la denominó glándula submaxilaris, sin embargo en 1935 en Jena, en la reunión de anatomistas para redactar la nomenclatura anatómica, se decide que al cambiar el término maxilar inferior por mandíbula, y así esta glándula pasa a denominarse glándula submandibular. Este término es el que actualmente se utiliza (FCAT, 2001).

La glándula salivar submandibular es una glándula tubuloacinososa, que en seres humanos es mixta, con predominio de células serosas, por lo que también se denomina seromucosa. El volumen de esta glándula es algo menor de la mitad de la glándula parótida y ocupa la parte lateral de la región suprahioidea, entre la mandíbula y el músculo milohioideo. Uno de los detalles morfológicos más importantes de la glándula es la existencia en el adulto de la prolongación anterior (proceso sublingual), que se dispone entre los músculos milohioideo e hiogloso. Entre esta prolongación y el resto de la glándula existe una profunda escotadura que se relaciona con el borde posterior del músculo milohioideo. El conducto excretor (Wharton) macroscópicamente, se inicia a partir de la prolongación sublingual de la glándula y desemboca en la carúncula sublingual; localizada a ambos lados del frenillo lingual. El nervio hipogloso acompañado de la vena lingual está

en relación con la cara profunda de la glándula. El nervio lingual y su ganglio anexo de carácter parasimpático se relacionan con el conducto excretor de la glándula.

Finalmente la arteria facial se localiza entre la glándula y el músculo milohioideo y mandíbula para disponerse sobre el borde inferior de la mandíbula por delante de la inserción del músculo masetero. La vena facial cruza oblicuamente la cara superficial de la glándula. (Orts Llorca, 1986, Standring, 2008).

## HISTOLOGÍA DE LA GLANDULA SALIVAR SUBMANDIBULAR

La estructura histológica de las glándulas salivares se asemeja a un racimo de uva, en el que las uvas corresponden a los acúmulos de células secretoras, mientras que los tallos, uniéndose y agrandándose representan el sistema de los conductos excretores.

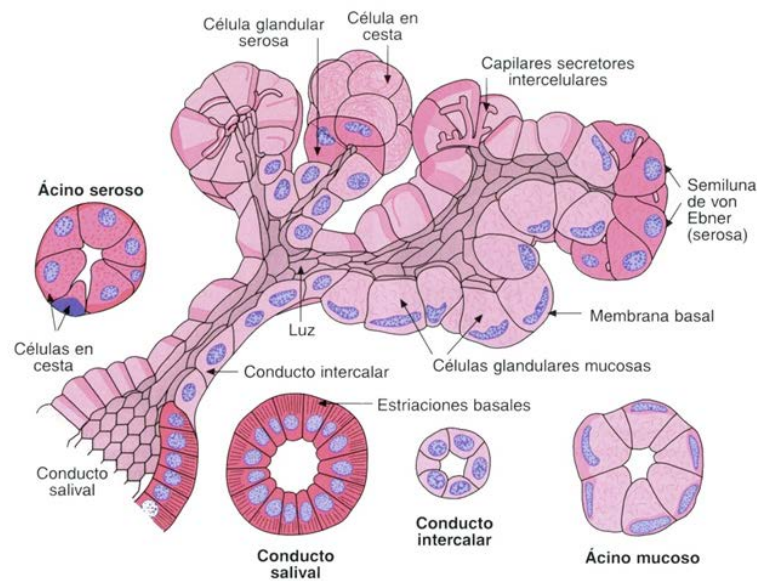
La unidad secretora básica de las glándulas salivares mayores, consta de un acúmulo de células secretoras, que recibe el nombre de acino, si es aproximadamente esférico, y de túbulo si tiene forma alargada. Adoptamos esta denominación de la unidad secretora glandular, siguiendo la propuesta realizada recientemente por Gilloteaux y Afolayan (2014). En este artículo los autores tratan de aclarar las discrepancias existentes en la terminología usada en la descripción morfológica de las glándulas salivares mayores, al constatar que los términos acino y alveolo se usan indistintamente como sinónimos; hecho que consideran incorrecto. El acino o túbulo está conectado a una serie de conductos cuyo calibre va aumentando progresivamente y se denominan, comenzando por el más proximal, el más cercano a las células secretoras: conducto intercalado, conducto estriado y conducto excretor.

Los conductos intercalados se unen para dar lugar a los conductos estriados, que se unen a su vez para formar los conductos excretores y

finalmente, estos se reúnen para constituir el conducto excretor principal (Osamu Amano y cols., 2012).

La glándula salivar submandibular, como ya hemos indicado, es de tipo mixto o seromucoso. Los acinos están formados por células mucosas en su extremo proximal y por células serosas en el extremo distal donde aparecen como una cubierta semilunar de células que se tiñen intensamente y que reciben el nombre de semiluna serosa. De acuerdo con esta descripción morfológica de las piezas secretoras de los extremos de la glándula debemos referirnos a ella como una glándula tubuloacinar compuesta (Guilloteaux y Afolayan, 2014). Las células de esta cubierta parecen estar separadas de la luz del acino por las células mucosas subyacentes, pero su secreción es conducida hacia la luz del acino, por medio de canales estrechos que se pueden encontrar entre las células mucosas. Entre las células secretoras y la lámina basal de todos los acinos existen células mioepiteliales altamente ramificadas. Se cree que su contracción acelera el flujo de saliva estrechando la luz del acino.

El conducto excretor principal posee un revestimiento epitelial pseudoestratificado, compuesto por células principales altas y otras basales pequeñas, así como algunas células caliciformes y ciliadas (Mjör y Fejerkov, 1993; Fawcett, 1995; Geneser, 2002; Gilloteaux y Afolayan, 2014).



Dibujo esquemático de las características histológicas de los acinos y de la primera porción del sistema de conductos excretores de la glándula submandibular. Geneser 2002

## DESARROLLO

Numerosos autores han analizado el desarrollo de la glándula submandibular desde diferentes perspectivas. Los iniciales estudios descriptivos en humanos señalaron su origen a partir de una proliferación del epitelio del suelo de la boca a nivel del surco paralingual medial (Dozin, 1963-1966; Young y Von Lennep, 1978; Serrano Cuenca, 1983; Orts Llorca, 1986; Mérida Velasco, y cols., 1993).

La mayoría describen la aparición del esbozo entre la 6<sup>o</sup>-7<sup>o</sup> semana del desarrollo, aunque con diferencias en el tamaño del embrión (Tabla I). Para la mayoría de los autores este epitelio es de origen endodérmico (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 1999; O'Rahilly y Müller, 2001; Larsen, 2003; Carlson, 2009; Moore, Persaud y Torchia, 2013;). Sin embargo, hay estudios contradictorios sobre el origen embrionario del epitelio. Se propuso un origen endodérmico tras los resultados obtenidos que mostraron que los progenitores de las glándulas salivares adultas pueden diferenciarse en

células B pancreáticas y hepatocitos cuando se trasplantan en hígados hepatectomizados (Hisatomi y cols, 2004). No obstante, este hecho no prueba que el epitelio salival es de origen endodérmico. Recientes experimentos de rastreo de linaje génico en ratones, que marca células endodérmicas, mostraron que el epitelio de las tres glándulas salivares mayores no era de origen endodérmico, lo cual sugiere un origen ectodérmico (Rothova y cols, 2012). Además los modelos animales con displasias ectodérmicas, o síndromes de desarrollo que afectan a estructuras de origen ectodérmico, sugieren que las principales glándulas salivares se originan a partir de precursores multipotentes comunes que residen en el ectodermo embrionario (Thesleff y Mikkola, 2002; Jaskoll y cols, 2003; Lombaert y Hoffman, 2010).

En humanos, el engrosamiento epitelial se invagina en el mesénquima subyacente e inicialmente forma un cordón sólido (Tabla II). Tras esta fase de invaginación se produce un crecimiento hasta formar ramificaciones distales que darán lugar a los acinos secretores de la glándula (Tabla III). Finalmente, en la morfogénesis de la glándula comienza a aparecer luz en los conductos (Tabla IV).

La condensación de mesénquima circundante al esbozo epitelial de la glándula dará lugar a la cápsula y estroma glandular. Este proceso ha sido descrito en embriones de diferente tamaño (Tabla V).



**Tabla I: Origen de la glándula submandibular en humanos (condensación epitelial)**

Tamaño embrión humano	Etapas Carnegie (EC)	Autor
10mm.		Thoma (1919)
12mm.	EC17	Rodríguez Vázquez y cols. (1984)
12-13mm.	EC17	Serrano Cuenca (1983)
14mm.		Chievitz (1885)
16mm.	EC18	Velázquez Santana (1952); Dozin (1966)
17mm.	EC18	Mérida Velasco y cols. (1993)

**Tabla II: Momento aparición yema (invaginación)**

Tamaño embrión humano	Etapas Carnegie (EC)	Autor
13mm.	EC17	Serrano Cuenca (1983)
13mm.	EC17	Rodríguez Vázquez y cols. (1984)
13mm.	EC17	Arráez Aybar (1991)
17mm.	EC18	Mérida Velasco J.A. y cols. 1993

**Tabla III: Comienzo de la fase de ramificación**

Tamaño embrión humano	Etapas Carnegie (EC)	Autor
19mm.	EC20	Serrano Cuenca (1983); García García y cols. (1991)
19-20mm.	EC20	Mérida Velasco y cols. (1993)
20mm	EC20	Rodríguez Vázquez y cols. (1984)
20mm.		Thoma (1919)

**Tabla IV: Canalización o tunelación del conducto**

Tamaño embrión humano	Etapas Carnegie (EC)	Autor
20-22mm.	EC20	Serrano Cuenca (1983); Arráez Aybar (1991)

**Tabla V: Momento aparición cápsula**

Tamaño embrión humano	Etapas Carnegie (EC)	Autor
16mm.	EC16	Serrano Cuenca (1983)
	EC18	Rodríguez Vázquez y cols. (1984)
27mm.	EC23	Mérida Velasco y cols. (1993)

## FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MORFOGÉNESIS GLANDULAR

*Mesénquima*

Es bien conocido que al igual que ocurre con otras estructuras glandulares, el desarrollo de las glándulas salivares depende de una serie continua de interacciones epitelio-mesénquimales (O'Rahilly y Müller 2001; Sakai y cols., 2003). La importancia de este proceso la encontramos por primera vez descrita en los trabajos de Borghese (1950) en los que concluye que la glándula submandibular presenta una interacción epitelio mesénquima que condiciona la ramificación glandular. Hsu y cols. (2010), describen que durante este proceso de ramificación, las interacciones entre el epitelio y el mesénquima, ocasionan cambios en la síntesis y distribución de las proteínas de la matriz extracelular, alteraciones en las uniones célula-célula y célula-matriz y cambios en el crecimiento y contractilidad celular.

Grobstein (1953), cultivó epitelio aislado de la glándula submandibular de ratón en mesénquima de distintos orígenes. En su opinión, para el desarrollo normal del sistema de acinos de esta glándula, es necesario el mesénquima capsular de esta glándula. Siguiendo estos estudios, años después, Lawson (1972) concluye que la presencia de mesénquima propio de la glándula es necesaria para un completo desarrollo morfológico y funcional.

Realizando estudios "in vitro" en ratas, Cutler (1977) observó contactos directos entre el mesénquima y las células epiteliales del brote invaginado en las primeras fases de proliferación, días 15 y 16. En estudios posteriores observó que, rudimentos epiteliales de glándula submandibular de rata de 16 días eran capaces de citodiferenciarse sin presencia de mesénquima, mientras que los rudimentos de 15 días no eran capaces de citodiferenciarse en ausencia del mesénquima. A partir de estas observaciones concluye que, sin la presencia de contactos entre las células epiteliales y el mesénquima en los estadios previos a la ramificación, no se

producen ni la morfogénesis glandular ni los procesos de citodiferenciación (Cutler, 1980). Denny y cols. (1997) revisan estos trabajos de Cutler y consideran que esta ventana de tiempo (día 15-16) es el periodo durante la cual las células mesenquimales, neuronas y células epiteliales del brote parecen romper la integridad de la lámina basal y establecen contactos cercanos y transitorios, como uniones celulares rudimentarias. Para ellos, este tipo de interacción entre las células epiteliales y las mesenquimales dura solo 2 días y no ocurre en ningún otro momento o fase del desarrollo de la glándula submandibular. Así les parece posible que de alguna manera los procesos de citodiferenciación se completan durante este periodo de tiempo, antes de que los mecanismos que promueven el crecimiento morfogenético hayan sido totalmente activados; concluyendo que es concebible que estos contactos estén implicados en la transmisión de importantes señales para el desarrollo de la glándula.

Nogawa (1983) realiza un estudio in vitro, en el que utiliza recombinaciones de epitelio y mesénquima de rudimentos de glándula submandibular de ratón de 13 y 14 días, para establecer la influencia del mesénquima en las curvaturas y diámetro de los lóbulos durante el proceso de ramificación. Concluye este autor que los lóbulos epiteliales de la glándula se hacen cada vez más pequeños según acontece el desarrollo in vivo. Los experimentos de recombinación muestran que el mesénquima de los rudimentos de 14 días es mucho más activo induciendo la ramificación del epitelio que el de 13 días. Su experimento sugiere que el mesénquima submandibular causa ramificación del epitelio definiendo la curvatura de la superficie del epitelio, más concretamente la curvatura de la lámina basal.

Kashimata y Gresik (1996) en sus estudios en ratones y ratas concluyen que el proceso de ramificación de las glándulas salivares de ratones y ratas:

- a) es directamente dependiente de la cantidad de mesénquima presente
- b) solo se produce en presencia de mesénquima vivo

- c) está vitalmente influenciada por componentes de la matriz extracelular (colágeno y proteoglicanos)
- d) requiere la existencia de la lámina basal del rudimento epitelial
- e) involucra continuas transiciones de la lámina basal epitelial
- f) requiere una crucial participación del esqueleto epitelial basado en actina
- g) puede darse en la ausencia de proliferación celular y síntesis de nuevas proteínas.

También se han realizado estudios de recombinación de epitelio y mesénquima entre aves y mamíferos, con resultados que resaltan la importancia del mesénquima en el desarrollo de la glándula. En el trabajo de Nogawa y Mizumo (1981) recombinaron in Vitro epitelio y mesénquima entre la glándula submaxilar anterior de codorniz (de tipo alargado) y la lingual anterior de codorniz o submaxilar de ratón (ambas de tipo ramificado) para clarificar si el proceso de alargamiento era dirigido por el componente epitelial o por el mesenquimal. El epitelio de la submaxilar anterior de codorniz recombinado con mesénquima de la lingual anterior de codorniz o submaxilar de ratón se ramificaba. De manera inversa, el epitelio de la glándula lingual anterior de codorniz o de la submaxilar de ratones de 12 días, recombinado con mesénquima de la submaxilar anterior de codorniz, se alargaba; aunque el mesénquima era menos efectivo con el epitelio submaxilar de ratones de 13 días. Estos resultados sugieren que durante la morfogénesis de las glándulas salivares de codorniz, el patrón de crecimiento del epitelio, alargado o ramificado, es controlado por el mesénquima.

Recientemente se ha demostrado que la ramificación de las glándulas salivares depende en gran medida de la acción señalizadora de shh sobre los FGF (Iber y Menshykau, 2013). Sin embargo, en contraste con la mayoría de las estructuras glandulares donde el epitelio produce shh que actúa sobre el mesénquima subyacente, en las glándulas salivares la

secuencia entera de señalización de shh y respuesta de FGF ocurre dentro del mesénquima.

La cascada de transformaciones que ocurre en el parénquima de las glándulas salivares durante las distintas fases de su desarrollo está regulada por una variedad de factores liberados por el mesénquima, cuyos receptores se encuentran en la membrana plasmática de las células epiteliales.

Dentro de los más importantes señalaremos los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) siendo los más estudiados FGF7 y FGF10. Estos factores desempeñan un papel fundamental en los estadios iniciales de la formación glandular; estudios con ratones nulos para FGF10, en los cuales se consigue anular su expresión, se produce aplasia o agenesia glandular; (Ohuchi y cols, 2000; De Moerlooze y cols., 2000; Jaskoll y cols., 2005; Patel y cols., 2006; Tucker, 2007; Patel y Hoffman, 2013). Los FGFs también participan en el desarrollo de la ramificación glandular como se puede observar en trabajos realizados en ratones que demuestran que el FGF10 produce alargamiento de los conductos, mientras que FGF7 produce o estimula la aparición de brotes epiteliales, (Steinberg y cols., 2005; Patel y cols., 2006; Tucker, 2007; Rebustini y Hoffman, 2009; Patel y Hoffman, 2013). También es necesario destacar el papel de los receptores de estos factores, FGFR1 y FGFR2 que suelen localizarse a nivel epitelial (Hoffman y cols., 2002; Patel y cols., 2006). Trabajos en los que se disminuyó la expresión y señalización de FGFR1 y FGFR2, resultaron en una disminución de la ramificación de la glándula submandibular (Hoffman y cols., 2002; Steinberg y cols., 2005; Patel y cols., 2006). Parece ser que los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), modulan la expresión de los FGF. Un trabajo realizado en ratón ICR y que estudia el papel de los receptores de factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF-R) en el desarrollo de la glándula submandibular; indica que los PDGF modulan la señal de los FGF; de tal manera que añadiendo PDGF a los cultivos inducen la expresión de

FGF y aumenta la proliferación epitelial (Yamamoto y cols., 2008; Patel y Hoffman, 2013).

El factor de crecimiento epitelial (EGF) también participa en la regulación del desarrollo de la glándula durante la fase de ramificación Morita y Nogawa (1999). Este factor estimula la ramificación de la glándula submandibular en ratones al regular la expresión de  $\alpha 6$  integrina (Kashimata y Gresik, 1997; Tucker, 2007). Parece ser que otra de las vías que utiliza este factor para estimular la ramificación de la glándula submandibular es la activación a nivel intracelular de la proteína quinasa mitógeno-activada (MAPK), ERK-1/2 (Kashimata y cols., 2000).

Otros factores con un papel importante durante la fase de ramificación glandular son; los factores de crecimiento transformante (TGFs) y las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs). Cuando se añaden TGFs a los cultivos de glándula submandibular aumenta la ramificación aunque no se producen defectos en las glándulas salivares en los ratones nulos para TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 (Jaskoll y cols., 1994; Jaskoll y Melnick, 1999; Tucker, 2007). Por otro lado, parece ser que BMP4 inhibe la ramificación de la glándula submandibular mientras que BMP7 la estimula (Hoffman y cols., 2002; Patel y cols., 2006; Tucker, 2007).

Para que se produzca la canalización o formación de luz en los conductos y acinos glandulares, es necesario que se produzca tanto la muerte (apoptosis) de la mayoría de las células que forman la parte central de los cordones precursores de los conductos, para así crear un espacio que será la luz del conducto; como la proliferación y polarización de las células de la porción periférica que formarán las paredes del conducto (Tucker, 2007). En el balance entre apoptosis y proliferación, necesario para la formación de la luz de los conductos de la glándula submandibular, parece estar implicada la vía del factor de necrosis tumoral (TNF) (Melnick y cols., 2001; Tucker, 2007). De hecho la expresión de su receptor TNFR1 está asociada a los

sitios donde se produce la formación de luz en los conductos y acinos (Jaskoll y Melnick, 1999; Tucker, 2007).

### *Lámina Basal*

La composición de la lámina basal que rodea los lóbulos epiteliales primitivos es diferente según el potencial de crecimiento de la región. Alrededor del pedículo y en las hendiduras, la lámina basal contiene colágeno tipo I y tipo II, así como proteoglicano de membrana basal de tipo I (MB-I). Estos componentes no se observan en las regiones de los lóbulos que continúan creciendo. La lámina basal de las regiones en fase de crecimiento, bajo la influencia del mesénquima circundante, pierde el colágeno y los proteoglicanos asociados a las estructuras estables. Por otro lado, se ha descrito que la ramificación de los cordones epiteliales va precedida de un incremento local del número de mitosis en dichos cordones y de un engrosamiento de la lámina basal. La lámina basal engrosada estaría implicada en la estabilización del epitelio y la iniciación y mantenimiento de la ramificación. Se ha comprobado que con el tratamiento de hialuronidasa, que desorganiza los proteoglicanos de la membrana basal, se interfiere la ramificación de los extremos terminales de los cordones epiteliales.

Las ramificaciones se asocian, además de con alteraciones en la lámina basal, con la contracción local de microfilamentos ordenados en los ápices de las células epiteliales en los puntos de bifurcación. El mantenimiento continuado del crecimiento de los extremos de los lóbulos glandulares se mantiene gracias al alto grado de actividad mitótica del epitelio y al depósito en la zona de glucosaminoglucanos de nueva síntesis. La diferenciación funcional y estructural del epitelio de la glándula salival continúa durante la vida fetal (Kadoya y Yamashina, 1992; Kadoya y cols., 1995; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 1999, 2005; Carlson, 2009; Patel y Hoffman, 2013).

*Inervación*

Las glándulas salivares están inervadas ricamente por el sistema vegetativo. La acetilcolina liberada por los nervios parasimpáticos activa los receptores muscarínicos para estimular la secreción salivar. Los nervios simpáticos controlan la salivación a través de la activación de los receptores alfa y beta adrenérgicos que estimulan el fluido rico y la secreción en proteínas respectivamente.

Investigaciones recientes se han centrado en el papel de la inervación parasimpática en el desarrollo de la glándula submandibular. Experimentos de recombinación de epitelio y mesénquima con o sin el parasimpático muestran que en ausencia de este, la expresión de marcadores en células progenitoras epiteliales se reduce. Estos experimentos parecen sugerir que la inervación parasimpática mantiene la población de células progenitoras epiteliales en un estado indiferenciado durante la organogénesis salivar. La gangliogénesis parasimpática y la inervación glandular son sincrónicas con el desarrollo del epitelio de la glándula submandibular (Knox y cols., 2010). Además, factores neurotróficos que controlan la función del sistema parasimpático también influyen en el desarrollo de la glándula submandibular (Knox y cols., 2013). Otros estudios han descrito que el complejo ganglioneural lingual, que deriva de la cresta neural, se asocia al conducto de la glándula y produce la inervación de la glándula paralelamente a la organogénesis durante el periodo de ramificación (Ferreira y Hoffman, 2013; Pattel y Hoffman, 2013).

En contraste, el papel de los nervios simpáticos tiene menos efectos sobre el desarrollo de la glándula submandibular, aunque puede afectar a la función de la glándula (Ryu y cols., 2013).

Durante el desarrollo, en embriones humanos, Dozin (1963, 1966) describió que el complejo ganglioneural del nervio lingual precede a la aparición del esbozo epitelial de la glándula submandibular, considerando que tiene un



papel de inducción y control de la formación glandular. Este mismo autor consideró que el complejo ganglioneural y el mesénquima denso periglandular constituyen un conjunto indisoluble, cuya evolución y topogénesis condiciona la normal evolución glandular. Rodríguez Vázquez y cols., (1984) comentan que el ganglio submandibular y el reguero mesenquimal que le acompaña condicionan procesos inductivos a los órganos regionales del suelo de la boca, que reaccionan y a su vez armonizan el proceso morfogenético bucal.

Arráez Aybar (1991), consideró que este complejo parece delimitar que porción del epitelio invaginado constituirá el conducto excretor y cual la glándula propiamente dicha.

Cutler y Chaundry, (1973) observaron contactos entre el mesénquima periglandular de embriones de rata y fibras nerviosas. También se han descrito contactos entre tejido nervioso del complejo ganglioneural y el epitelio, pero en estadios más avanzados. Los distintos autores los localizan en fetos humanos a nivel de los brotes epiteliales terminales (Gibson, 1983), en embriones humanos de estadio 21-22 (Mérida Velasco y cols., 1993) y en embriones de rata (Cutler, 1972).

## DESARROLLO DE LA GLÁNDULA SUBMANDIBULAR EN RATÓN Y RATA

No existen dudas en cuanto a la validez de los embriones de ratón y rata como modelos de estudio de los procesos organogénicos que acontecen durante el periodo embrionario (Gaubert-Cristol y Godlewski, 1991; Kashimata y Gresik, 1996; Patel y cols., 2006; Hsu y Yamada, 2010).

Anatómicamente las glándulas en roedores son similares a las humanas presentando un sistema de acinos y de conductos formado, al igual que las humanas, por conductos intercalados, estriados y excretores. Las diferencias con las humanas se dan en la localización; en los roedores se localiza en la región cervical anterior, entre los nódulos linfáticos

submandibulares y el esternón; y en el tipo de secreción, siendo la glándula submandibular de roedores serosa, a diferencia de lo que ocurre en humanos donde es mixta, serosa y mucosa (Osamu Amano y cols., 2012).

El desarrollo de la glándula en estos modelos animales se inicia en embriones de 11.5-12 días en ratón; y 14 días en rata (Denny y cols., 1997;.....). Este inicio se describe como un engrosamiento del epitelio próximo a la lengua; identificando éste hecho como la primera fase del desarrollo de la glándula o fase de pre-brote (Jaskoll y Melnick, 1999; Patel y cols. 2006; Tucker, 2007)

Cuando el embrión de ratón alcanza los 12-12,5 días el engrosamiento, se invagina y crece hacia el interior del mesénquima condensado (Hsu y cols., 2010), de origen neurocrestal (Patel y cols. 2006), formando un brote o yema epitelial; de aspecto esférico que se mantiene unido al epitelio del que se originó por medio de un tallo o cordón. Un día después (13,5 días), el brote de epitelio comienza a crecer y ramificar presentando un nivel de proliferación alto a nivel del epitelio y relativamente bajo a nivel del mesénquima. Como consecuencia de estos eventos, aparecen ramificaciones y varios brotes secundarios que darán lugar a los acinos glandulares. A los 14,5 días; se puede observar una estructura altamente ramificada con aspecto de glándula multilobular. A este periodo se lo conoce como fase pseudo glandular (Jaskoll y Melnick, 1999; Melnick y Jaskoll, 2000; Hsu y cols., 2010; Hayashi y cols., 2011).

Al alcanzar los 15,5 días la mayoría de los conductos empiezan a desarrollar luz en su interior. Esta luz se produce debido a que las células situadas en la zona interior de la ramificación, donde debe estar la luz del conducto, sufren procesos apoptóticos, mientras que en las células situadas en la periferia del futuro conducto aumentan los procesos proliferativos. A esta etapa se la denomina canalicular (Melnick y Jaskoll, 2000). Cuando alcanza los 17,5 días las ramificaciones y los brotes terminales se han ido

ahuecando para alcanzar la fase final, fase de yemas o brotes terminales. Aunque la continuidad entre el lumen del conducto principal y los conductos accesorios no está finalizada (Melnick y Jaskoll, 2000).

En definitiva, tanto en ratón como en rata los procesos que acontecen, anteriormente descritos, son similares; aunque se dan con una diferencia de 2 días aproximadamente. En ratón ocurren entre el día 11,5-12 y el 17 (Tabla VI); mientras que en la rata acontecen entre el día 14 y el 18 (Denny, 1997).

Tabla VI: calendario eventos en el desarrollo de la glándula en ratón según Jaskoll y Melnick, (1999).  
Según Denny y cols, (1997) en la rata estos eventos ocurren dos días después.

Fase	Días de desarrollo (E)	Evento
Pre brote	E 11,5-12	Engrosamiento del epitelio próximo a la lengua
Brote inicial	E 12,5	El engrosamiento epitelial se introduce en el mesénquima y adopta forma de brote unido por un tallo
Pseudoglandular	E 13,5	El brote epitelial comienza a ramificar, formándose ramas y brotes (aspecto multilobulado)
Canalicular	E 15,5	Comienza a formarse luz en las ramificaciones y en el tallo
Yemas o brotes terminales	E 17,5	La luz alcanza a los brotes terminales

## JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### JUSTIFICACIÓN

El desarrollo descriptivo de la glándula submandibular en humanos ha sido estudiado y sistematizado por numerosos investigadores (Velázquez Santana, 1952; Dozin, 1962; Serrano Cuenca, 1983; Rodríguez Vázquez y cols., 1984; Mérida Velasco y cols., 1984; García García y cols. 1991; Mérida Velasco y cols., 1993). Por otro lado, como ha quedado expuesto en la introducción, los modelos experimentales de ratón y rata ha establecido unos estadios en el desarrollo de la glándula que han permitido analizar los numerosos factores moleculares y bioquímicos que se relacionan con el desarrollo de la glándula (Kashimata y Gresik; 1996; Jaskoll y Melnick, 1999; Melnick y Jaskoll, 2000; Patel, 2006; Tucker; 2007; Hsu y Yamada, 2010; Hayashi y cols., 2011).

En este trabajo tratamos de estudiar el desarrollo de la glándula submandibular en embriones humanos y analizar las posibles influencias del mesénquima y estructuras nerviosas utilizando embriones de rata.

## HIPÓTESIS

Según se deduce del análisis bibliográfico existe una gran similitud entre los estadios evolutivos del desarrollo de la glándula submandibular en los embriones humanos y los de rata.

En este trabajo, se han utilizado técnicas inmunohistoquímicas con anti NF200 y NHK-1, evaluando en el desarrollo de la glándula submandibular de la rata, las estructuras nerviosas y derivados de la cresta neural así como su topografía y relaciones con el parénquima y estroma glandular.

Como hipótesis planteamos el aclarar las posibles influencias que estos elementos, mesénquima y estructuras nerviosas, tienen en el desarrollo glandular en embriones humanos. Para ello, realizamos un estudio descriptivo en embriones humanos coincidente con los estadios evolutivos en embriones de rata.

## OBJETIVOS

- Estudiar el desarrollo de la glándula submandibular en embriones humanos.
- Estudiar la expresión de anti NF200 y NHK1 en embriones de rata, que ponen en evidencia elementos nerviosos y el mesénquima derivado de la cresta neural.
- Relacionar los hallazgos obtenidos con las técnicas inmunohistoquímicas en rata y la morfología descriptiva del desarrollo de la glándula en embriones humanos, tratando de aclarar las posibles influencias de los elementos nerviosos y mesénquima en el desarrollo de la glándula submandibular.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *1.- Desarrollo de la glándula submandibular en embriones humanos.*

Se ha estudiado la región submandibular de 21 embriones humanos pertenecientes a la Colección del Instituto de Embriología de la Universidad Complutense de Madrid.

Los especímenes tenían una longitud mayor (GL) que abarcaba entre 10 y 28mm., correspondientes a los estadios (EC) 16-23 de la Carnegie. Los parámetros usados para determinar la edad de postconcepción fueron, la longitud máxima (GL) y criterios internos y externos siguiendo los estudios de la Carnegie (O’Rahilly and Müller, 2001; 2010).

Los especímenes fueron fijados, en su día, en formol neutro al 10%; seguidamente se deshidrataron con alcohol a concentraciones crecientes aclarando en unos casos con benzoato de metilo y benceno (especimen GI-1) y con butanol (el resto) e incluidos posteriormente en parafina según la técnica de Peterfi.

Posteriormente, se les realizaron cortes seriados en grosores de 10-15 micras. Las tinciones fueron teñidas con diferentes técnicas (hematoxilina-eosina; azan, tricrómico de Masson y Bielchowsky) según el proceder de McManus y Mowry (1968).

El plano de sección, la longitud mayor (GL) y el periodo del desarrollo se exponen en la Tabla VII.

**Tabla VII. Características morfológicas de los embriones humanos estudiados**

Embrión	Tamaño mm (GL)	Estadio Carnegie (EC)	Plano sección
Se	10	16	Frontal
Ph	11	16	Frontal
MTD	12	17	Frontal
GI1	12,5	17	Frontal
GIV	13	17	Frontal
FAUS6	13,6	17	Frontal
GV3	15	18	Sagital
NO	15	18	Frontal
CU	15,5	18	Frontal
CIV2	16	19	Frontal
CIV1	18	19	Frontal
MAR2	18	19	Frontal
PR19	19	20	Sagital
BR3	20	20	Sagital
CAS	20	20	Frontal
BOT	21	20	Sagital
NO	21	20	Frontal
GV7	22	21	Sagital
Pt10	26	22	Frontal
GI4	26,5	22	Frontal
BR	28	23	Frontal



## *2.- Desarrollo de la glándula submandibular en embriones de rata*

Se han utilizado embriones de rata (Wistar) de 14 a 19 días de edad (E14, E19), considerando el día de fertilización como día 0 (E0), basándonos en el control citológico vaginal.

Los especímenes eran extraídos tras la anestesia y disección de las madres. Los especímenes fueron fijados en paraformaldehído al 4% en 0,1 M en suero fosfato salino tamponado (PBS) a pH 7.4 a 4° C. Se han usado 5 especímenes de cada estadio. Los embriones fueron deshidratados y procesados en parafina. Las secciones se realizaron entre 6-8 µm de grosor y montadas en portas impregnados en poly-L-lisina. Para la orientación de las secciones algunos se les realizó una tinción con hematoxilina-eosina (HE).

## *3.- Estudio inmunohistoquímico*

Los anticuerpos empleados han sido:

1. Anticuerpo monoclonal contra neurofilamento de peso molecular de 200 kd, desarrollado en ratón: anti-NF 200, clon NE 14 (Sigma).
2. Anticuerpo contra IgG de ratón PAP conjugado desarrollado en cabra (Sigma).
3. Anticuerpo monoclonal NHK-1 (Becton&Dickinson, CA)
4. Anticuerpo contra IgM de ratón conjugado con PAP (Chemicon)

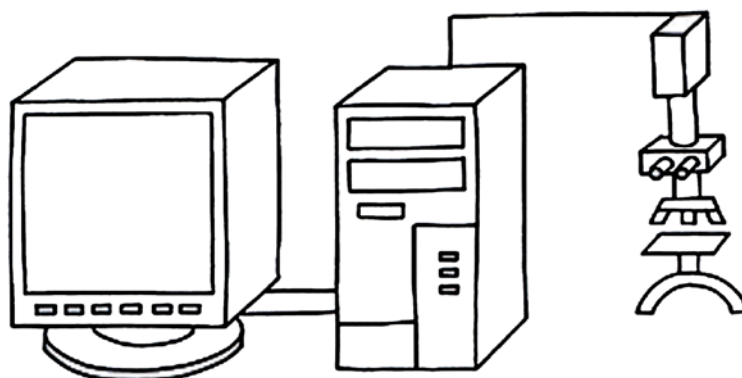
El anticuerpo primario anti NF-200 es un marcador para fibras nerviosa (Triviño Casado y cols., 2002). El anticuerpo primario NHK-1 es un marcador de tejido neuroectodérmico (Mérida Velasco y cols., 2012)

El protocolo seguido en el método inmunohistoquímico de peroxidasa antiperoxidasa (PAP) fue:

1. Desparafinado
2. Lavado en suero fosfato salino tamponado (PBS) (2 pasos de 15 minutos)
3. Bloqueo de la peroxidasa (2-3 horas)
4. Lavado en PBS (2 lavados de 30 minutos)
5. Eliminación de la señal de fondo incubando en suero normal de cabra (NGS, Sigma; USA) al 10% y 0,2 % en TX-100 (Merck, Germany) diluido en PBS a temperatura ambiente durante 24 horas
6. Incubación en Ac primario durante 48 horas a 4° C. Diluyente del suero PBS con 1% de NGS y 0.2% de TX-100. Dilución 1/20
7. Incubación en AC secundario durante 12 horas. Dilución (1/2500)
8. Lavado con PBS (3 veces durante 10 minutos)
9. Revelado con diaminobencidina (DAB)
10. Lavado con PBS (3 veces durante 10 minutos)
11. Deshidratar y montar en Eukitt (O.Kindler GmbH and Co, Germany)

Finalmente, se realizaron los controles negativos eliminando la primera capa (antiNF y anti NHK1) que era sustituido con un 1% de NGS y 0,2% de TX-100, para demostrar que el anticuerpo secundario se une solamente a su correspondiente anticuerpo primario.

El estudio morfodescriptivo se realizó con un microscopio Nikon Eclipse DXM 1200, acoplado a Pc Pentium IV.



Este estudio se ha realizado siguiendo las recomendaciones de la Declaración de Helsinki 1995 (revisadas en Edimburgo, 2000). Este trabajo ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

### Signatura de las figuras

B	Nervio bucal	MD	Músculo digástrico
C	Placoda epitelial	ML	Músculo milohioideo
CM	Cartílago de Meckel	NL	Nervio lingual
DI	Nervio dentario inferior	NM	Nervio mandibular
F	Arteria facial	O	Esbozo del ojo
G	Ganglio parasimpático lingual	P	Esbozo parotídeo
GD	Germen dentario	PL	Surco paralingual lateral
GE	Músculo geniogloso	PM	Surco paralingual medial
GH	Músculo genihioideo	PP	Proceso palatino
GS	Glándula submandibular	S	Conducto excretor
H	Nervio hipogloso	V	Vasos
L	Lengua	VF	Vena facial
M	Mandíbula		

## RESULTADOS

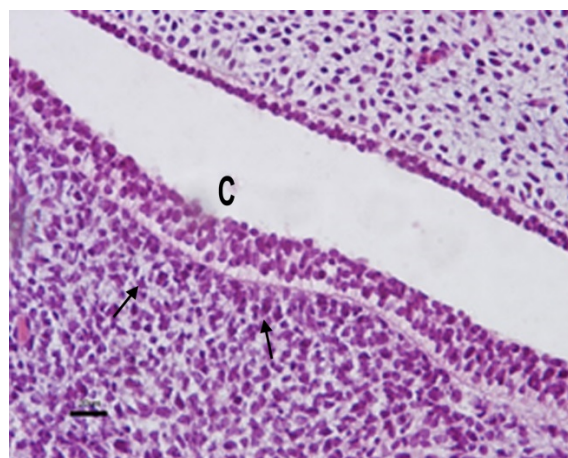
### EMBRIONES HUMANOS

#### *Estadio 16*

En el embrión de menor tamaño estudiado por nosotros, aparece a ambos lados del esbozo lingual una condensación epitelial (placoda) en la región del esbozo del surco paralingual medial. A cierta distancia se observa la llegada del nervio hipogloso al mesénquima indiferenciado de la lengua. Subyacente a la placoda el mesénquima aparece condensado (figs. 1 y 2). Una nítida membrana basal separa el epitelio del mesénquima (fig. 2).



**Fig. 1.-** Embrión humano Se 10 mm GL. Sección frontal. Hematoxilina-eosina. Esbozo lingual (L). Nervio hipogloso (H). Placoda epitelial, esbozo del surco paralingual medial (flecha). Condensación epitelial (C).

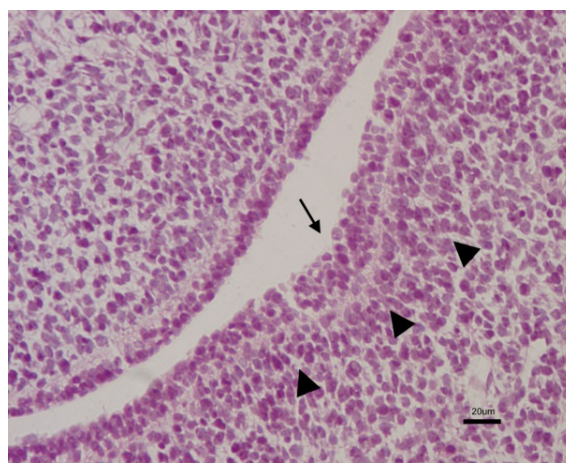


**Fig. 2.-** Aumento de la figura anterior. Condensación mesenquimal. (flechas). Condensación epitelial (C).

En embriones de 11mm GL, el esbozo del surco paralingual medial, con una evidente formación placodial, es más nítido observándose a cierta distancia el nervio lingual y el ganglio parasimpático anexo (figs. 3 y 4). Durante este estadio no hemos observado signos que evidencien el surco paralingual lateral. A nivel del fondo del surco transverso de la boca primitiva aparece una condensación epitelial que corresponde al esbozo parotídeo (fig. 3).



**Fig. 3.-** Embrión humano PH 11mm.GL. Sección frontal. Hematoxilina-eosina. Condensación epitelial esbozo parotídeo (**P**). Ganglio parasimpático lingual (**G**). Lengua (**L**). Surco paralingual medial (**flecha**).



**Fig. 4.-** Aumento de la figura 3. Surco paralingual medial (**flecha**). Condensación mesenquimal (**cabezas de flecha**).



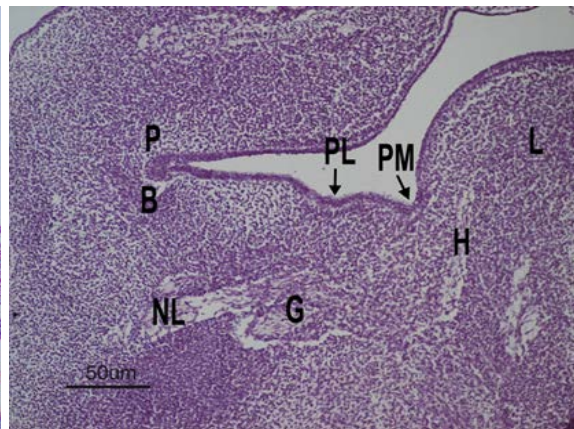
*Estadio 17*

En el estadio 17, la boca primitiva posee claramente diferenciados los surcos paralingual medial y lateral. En las secciones anteriores se observan los surcos paralingual medial y lateral, siendo el primero más profundo. EL surco paralingual medial se relaciona con las fibras del nervio hipogloso que invaden el mesénquima indiferenciado del esbozo lingual.

Caudal al surco paralingual lateral se sitúa el nervio lingual rodeado por mesénquima indiferenciado del primer arco. Puede observarse con claridad (figs. 5, 6), la relación que establece el nervio lingual con las neuronas del ganglio submandibular. A este nivel y en el extremo del surco transverso de la boca se sitúa el nervio bucal. (figs. 5, 6).

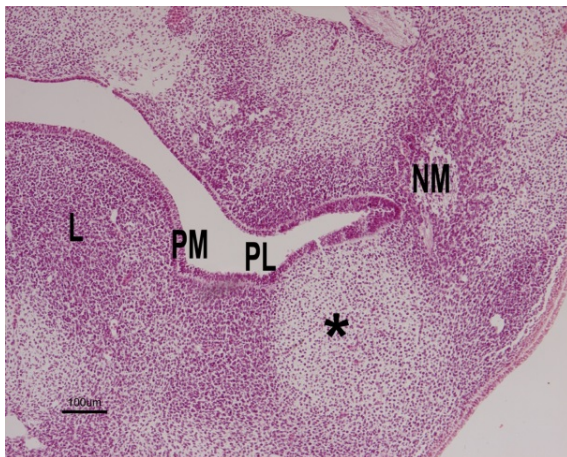


**Fig. 5.-** Embrión humano FAUS 6; 13,6 mm. GL; Sección frontal. Hematoxilina-eosina. Lengua (L). Nervio hipogloso (H). Nervio lingual (NL). Ojo (O). Surco paralingual medial (flecha). Surco paralingual lateral (cabeza de flecha).



**Fig. 6.-** Aumento de la figura 5. Lengua (L). Nervio hipogloso (H). Nervio lingual (NL). Ganglio parasimpático lingual (G). Esbozo epitelial parotídeo (P). Nervio bucal (B). Surco paralingual lateral (PL). Surco paralingual medial (PM).

Durante este estadio se observa en las secciones anteriores de estos especímenes, cambios en la estructura del mesénquima del primer arco en esta región. El mesénquima, subyacente al epitelio dispuesto entre el surco paralingual lateral y el fondo del surco transverso de la boca primitiva, aparece más laxo (fig. 7). Además el epitelio de la placoda del surco paralingual medial muestra como los núcleos de las células se polarizan hacia la cavidad bucal. Una clara membrana basal delimita los citoplasmas del mesénquima condensado subyacente (fig. 8).



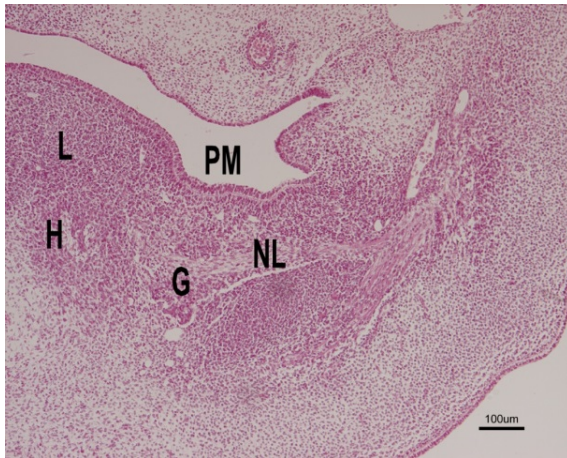
**Fig. 7.-** Embrión humano MTD, 12 mm., Hematoxilina-eosina. Sección frontal. Surco paramedial lingual (**PM**). Surco paralingual lateral (**PL**). Lengua (**L**). Nervio mandibular (**NM**). El mesénquima dispuesto entre el surco paralingual lateral y el fondo del surco transverso de la boca primitiva, aparece más laxo (\*).



**Fig. 8.-** Aumento de la figura 7. Surco paralingual medial (**PM**). Surco paralingual lateral (**PL**). El mesénquima que rodea los surcos paralinguales medial y lateral aparece condensado (**cabezas de flechas**).

Dorsalmente y a la altura del nervio lingual y su ganglio, esta disposición es similar sin embargo el epitelio muestra la polarización celular menos acentuada. (figs. 9, 10 y 11).

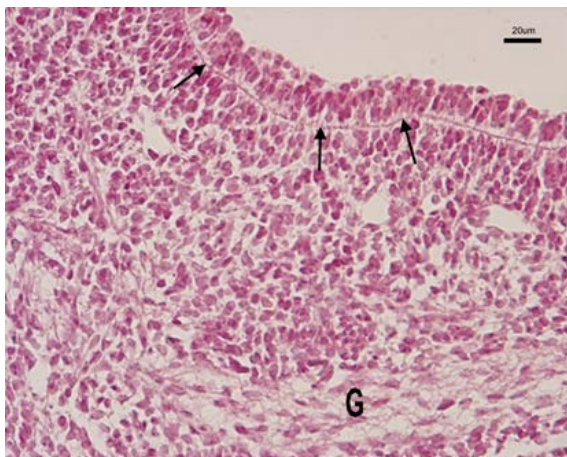




**Fig. 9.-** Embrión humano MTD, 12 mm. Hematoxilina-eosina. Sección frontal. Surco paralingual medial (**PM**). Lengua (**L**). Nervio hipogloso (**H**). Nervio lingual (**NL**). Ganglio parasimpático lingual (**G**).



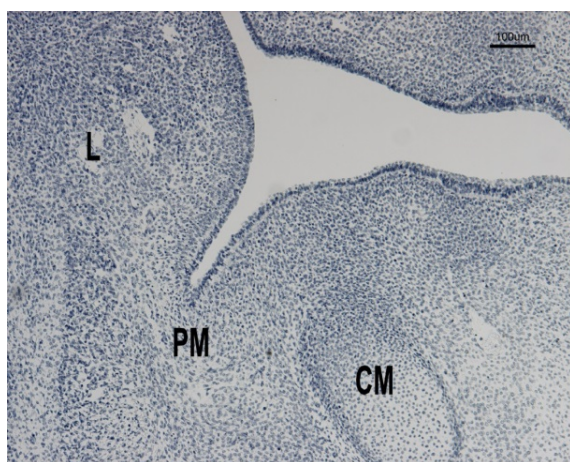
**Fig. 10.-** Aumento de la figura 9. Surco paralingual medial (**PM**). Lengua (**L**). Ganglio parasimpático lingual (**G**).



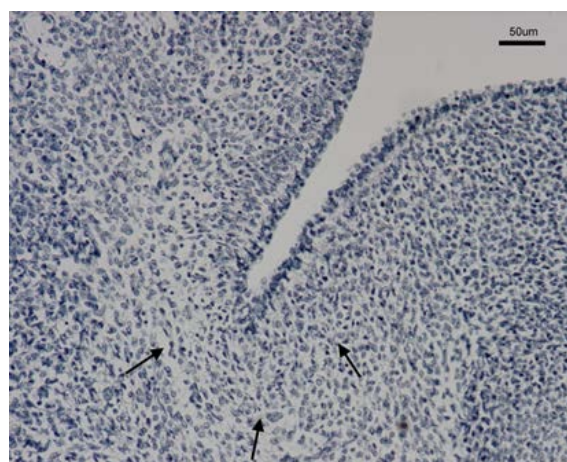
**Fig. 11.-** Aumento de la figura 9. Las flechas señalan la membrana basal (**flechas**) que se dispone entre el epitelio del surco paralingual medial y la condensación mesenquimal subyacente. Ganglio parasimpático lingual (**G**).

Durante este periodo uno de los especímenes analizados presentaba un estado más avanzado de desarrollo. En las secciones anteriores se puede apreciar la condensación del epitelio del surco paralingual medial (figs. 12, 13 y 14). La invaginación del mismo aparece rodeada por mesénquima de aspecto piriforme. El epitelio condensado comienza a invaginarse hasta alcanzar el complejo ganglioneural lingual. El mesénquima que rodea el epitelio descansa sobre el complejo ganglioneural (fig. 15, 16)

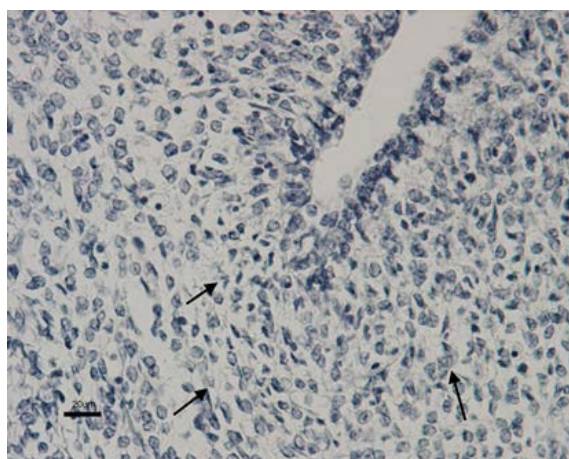




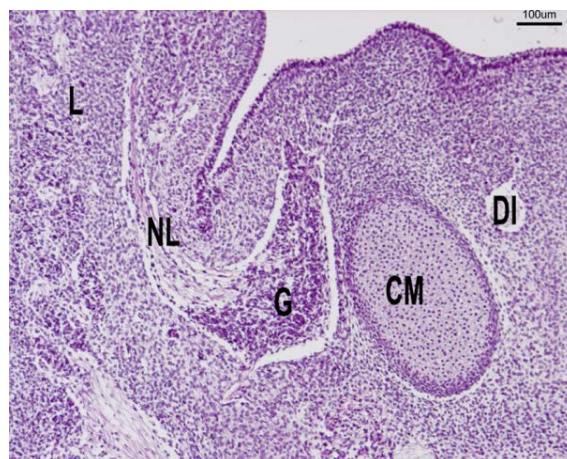
**Fig. 12.-** Embrión humano GI-2, 12,5 mm. Sección frontal. Tricrómico. Cartílago de Meckel (CM). Surco paralingual medial (PM). Lengua (L).



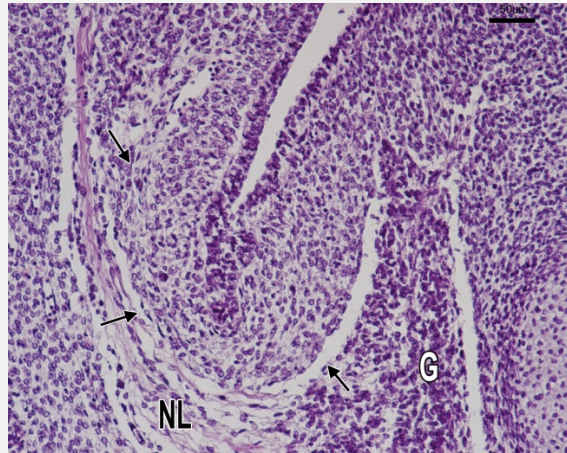
**Fig. 13.-** Aumento de la figura 12. Obsérvese la condensación mesenquimal alrededor del surco paralingual medial (flechas).



**Fig. 14.-** Aumento de la figura 12. Flechas delimitan la condensación mesenquimal globiforme o piriforme.



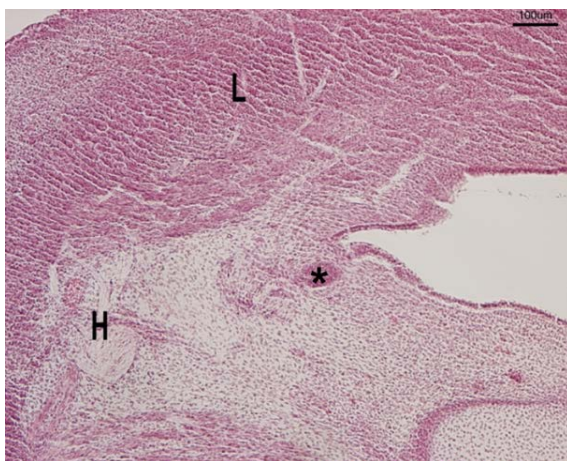
**Fig. 15.-** Embrión humano GI-2, 12,5 mm. Sección frontal. Hematoxilina-eosina. La invaginación del epitelio del surco paralingual medial se relaciona con el complejo ganglio neural lingual. Ganglio parasimpático lingual (G). Nervio lingual (NL). Cartílago de Meckel (CM). Nervio dentario inferior (DI). Lengua (L).



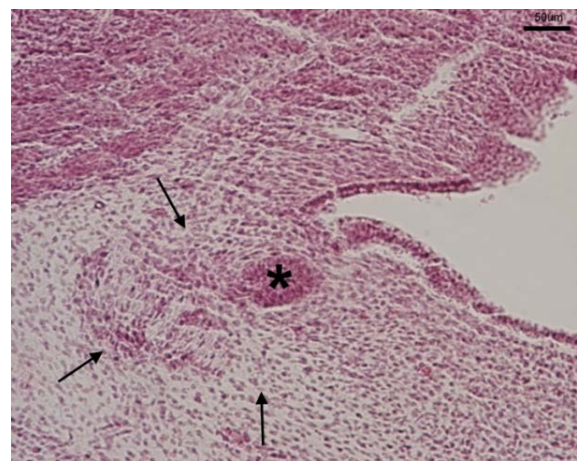
**Fig. 16.-** Aumento de la figura anterior. La invaginación epitelial está rodeada de mesénquima de aspecto piriforme (**flechas**). Nervio lingual (**NL**). Ganglio parasimpático lingual (**G**).

### *Estadio 18*

Todos los especímenes de este estadio mostraban el epitelio invaginado sin luz y rodeado de mesénquima claramente condensado y localizado dorsal al epitelio invaginado (figs. 17, 18).



**Fig. 17.-** Embrión humano GV3, 15mm. Sección sagital. Hematoxilina-eosina. El epitelio del surco paralingual medial se invagina y no muestra luz. Epitelio invaginado (\*). Lengua (**L**). Nervio hipogloso (**H**).



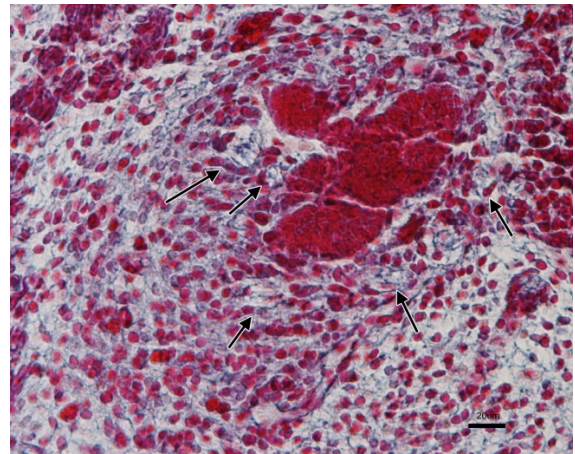
**Fig. 18.-** Aumento de la figura anterior. Epitelio invaginado (\*). Mesénquima relacionado con el epitelio invaginado (**flechas**).



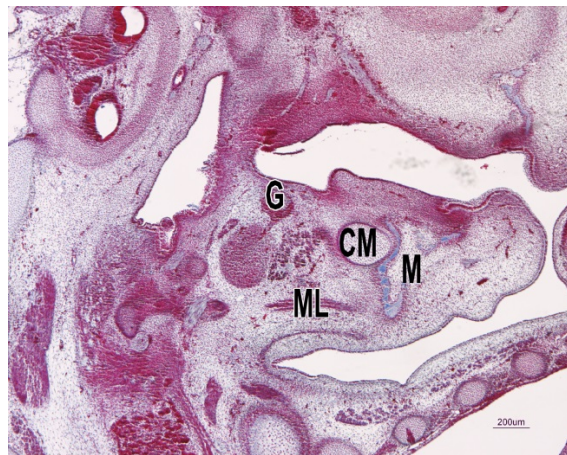
Además la parte distal del mesénquima aparece más condensado, contrastando notablemente con la porción más proximal o cercana al suelo de la boca, lugar donde se inició la invaginación (Figs. 19, 20, 21, 22, 23).



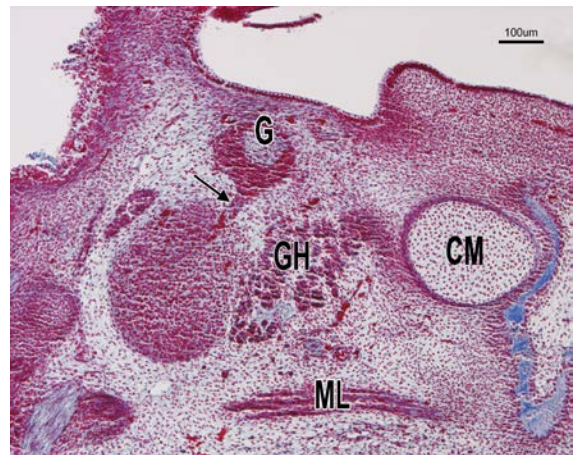
**Fig. 19.-** Embrión humano GV3, 15 mm. Sección sagital. Tricrómico. Al alcanzar el epitelio invaginado el complejo ganglioneural lingual, comienza su lobulación (**flecha**). Ganglio parasimpático lingual (**G**). Nervio hipogloso (**H**). Músculo milohioideo (**ML**). Músculo genihiioideo (**GH**).



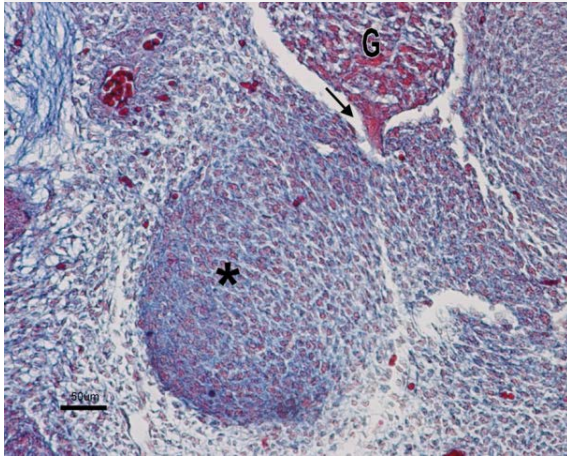
**Fig. 20.-** Aumento de la figura anterior. El epitelio comienza su lobulación y está rodeado por mesénquima condensada de aspecto globiforme que contiene ramas nerviosas procedentes del complejo ganglio neural lingual (**flechas**).



**Fig. 21.-** Embrión humano GV3, 15mm. Sección sagital. Tricrómico. La condensación mesenquimal que rodea al epitelio lobulizado y sin luz, se localiza craneal al músculo milohioideo y recibe ramas nerviosas del ganglio parasimpático lingual. Cartílago de Meckel (**CM**). Mandíbula (**M**). Músculo milohioideo (**ML**). Ganglio parasimpático lingual (**G**).



**Fig. 22.-** Aumento de la figura anterior. El ganglio parasimpático lingual (**G**) emite ramas nerviosas al mesénquima condensado (**flecha**). Cartílago de Meckel (**CM**). Músculo milohioideo (**ML**). Músculo genihiioideo (**GH**).



**Fig. 23.-** Embrión humano NO, 15 mm. Sección frontal. Azán. Se observan las ramas del ganglio parasimpático lingual (**flecha**) que alcanzan la condensación globiforme (\*). Ganglio parasimpático lingual (**G**).

El epitelio invaginado comienza a ramificarse al alcanzar el complejo ganglioneural lingual (figs. 19, 20).

Además durante este estadio comienza a emitir ramas el complejo ganglioneural lingual hacia el mesénquima que rodea el epitelio invaginado (figs. 20, 21, 22 y 23).

El mesénquima que rodea al epitelio en la región dorsal mantiene su aspecto globiforme o piriforme apoyándose sobre el músculo genihióideo (figs. 21, 22).

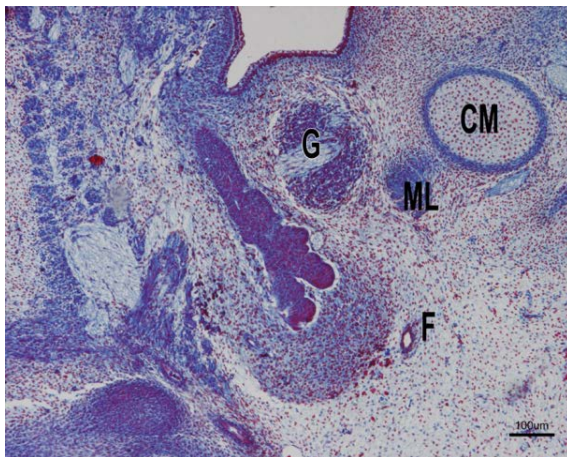
Dos especímenes del estadio (GV3, NO) mostraban una clara invasión del mesénquima globiforme, situándose éste dorsal al epitelio invaginado (figs. 22, 23).



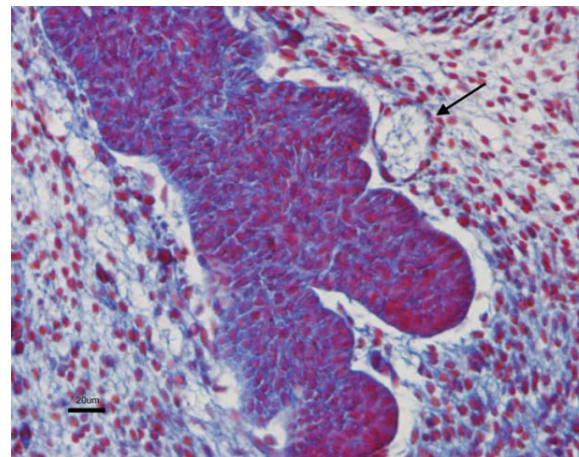
*Estadio 19*

Durante este estadio en el desarrollo de la glándula submandibular se observan cuatro eventos importantes:

1. La ramificación epitelial, dorsal al complejo ganglioneural, es más compleja, apareciendo yemas (fig. 24).
2. El epitelio invaginado comienza a organizarse. Periféricamente se alinea aunque aún no presenta luz. (fig. 24).
3. El mesénquima, de forma piriforme, que rodea a las ramificaciones epiteliales muestra una mayor condensación distal y contiene ramas nerviosas procedentes del ganglio parasimpático lingual (figs. 24 y 25).
4. La condensación mesenquimal se localiza sobre el borde posterior del músculo milohioideo; relacionándose superficialmente con la arteria facial (fig. 24).



**Fig. 24.-** Embrión humano CIV2, 16mm. Sección frontal. Azán. El epitelio invaginado aparece claramente lobulado cuando sobrepasa al complejo ganglioneural lingual (G). Cartílago de Meckel (CM). Músculo milohioideo (ML). Arteria facial (F).

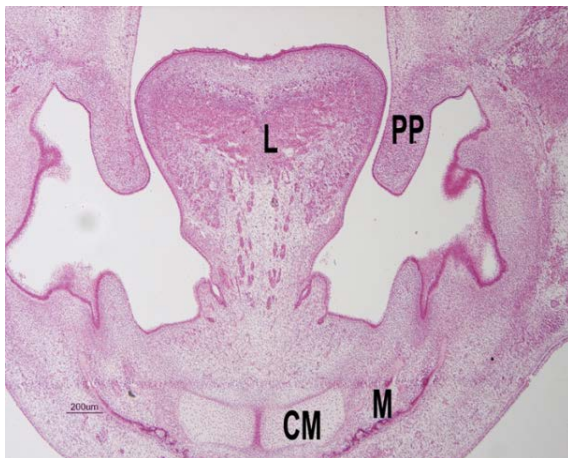


**Fig. 25.-** Ampliación de la figura anterior. Se observa nítidamente la lobulación epitelial y su organización celular. Rama nerviosa en el interior de la condensación mesenquimal (flecha).

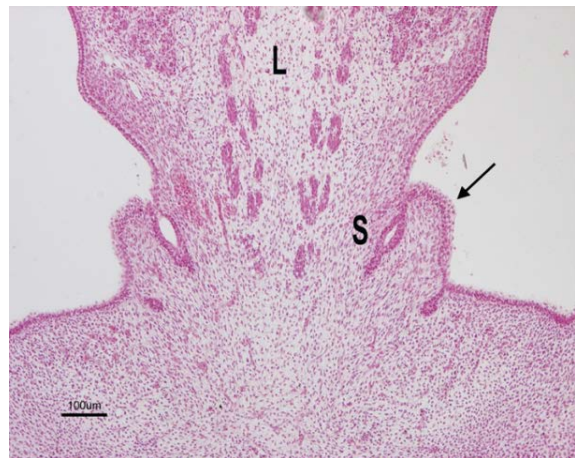
*Estadio 20*

Durante este estadio observamos procesos determinantes en la morfogénesis de la glándula submandibular y su conducto excretor:

1. En las secciones anteriores se contempla la elevación de la papila salival sublingual, donde desemboca el conducto excretor de la glándula submandibular (figs. 26, 27).
2. El conducto excretor glandular comienza a presentar luz (figs. 28, 29), sin embargo a nivel del esbozo de los acinos no hay signos de luz en su interior. El mesénquima se organiza alrededor del conducto excretor glandular.
3. La ramificación epitelial es más compleja y la condensación mesenquimal sobrepasa al músculo milohioideo
4. En la condensación mesenquimal se evidencian estructuras vasculares (figs. 30 y 31).

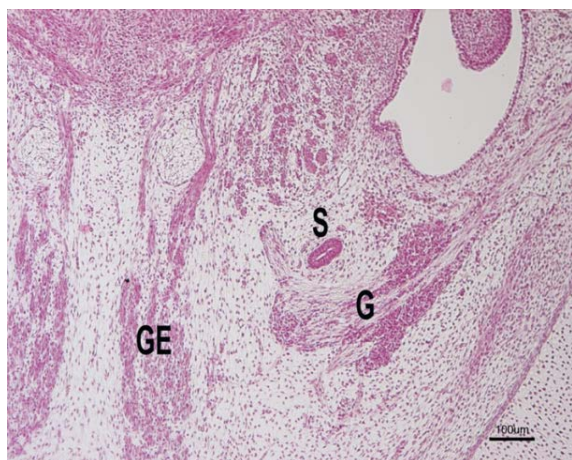


**Fig. 26.-** Embrión humano CAS, 20 mm. Sección frontal. Hematoxilina-eosina. Lengua (L). En las secciones más anteriores de este espécimen se observa la desembocadura del conducto excretor glandular, así como la elevación en el suelo de la boca de la papila salivar sublingual. Cartílago de Meckel (CM). Mandíbula (M). Lengua (L). Proceso palatino (PP).

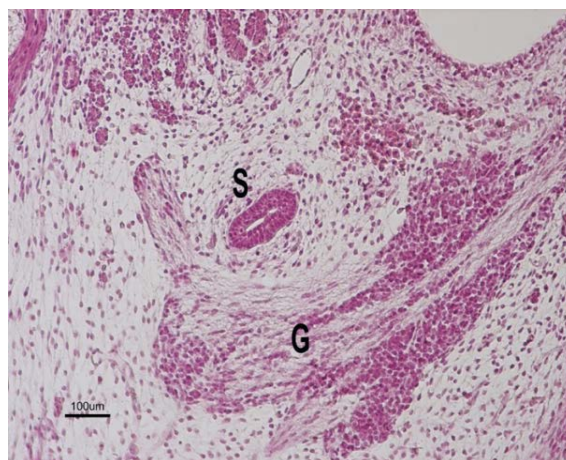


**Fig. 27.-** Aumento de la figura anterior. Lengua (L). Desembocadura del conducto excretor (S). Papila salivar sublingual (flecha).

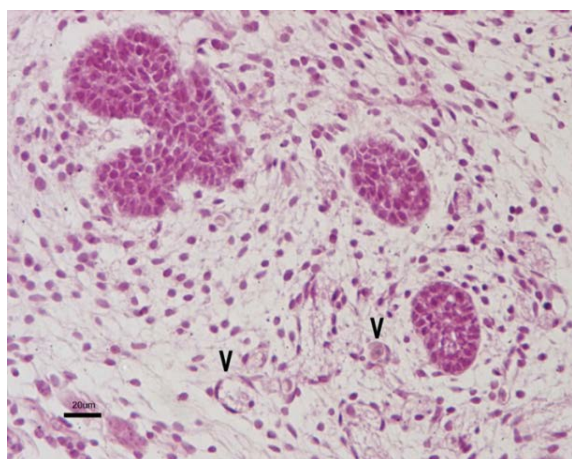




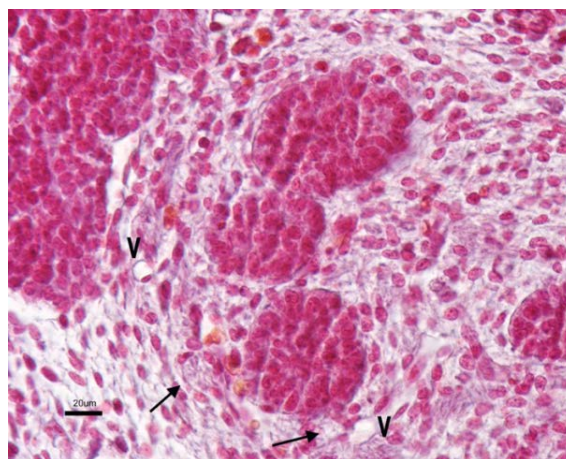
**Fig. 28.-** Embrión humano CAS, 20 mm. Sección frontal. Hematoxilina-eosina. El conducto excretor glandular submandibular (S) presenta luz y se dispone sobre el ganglio parasimpático lingual (G). Músculo geniogloso (GE).



**Fig. 29.-** Aumento de la figura anterior. Conducto excretor submandibular (S). Ganglio parasimpático lingual (G). El mesénquima rodeando al conducto excretor aparece organizado.



**Fig. 30.-** Embrión humano CAS, 20 mm. Sección frontal. Hematoxilina-eosina. La división de los acinos en la parte distal del esbozo glandular es más compleja. En el interior del mesénquima que rodea a los acinos aparecen vasos (V).



**Fig. 31.-** Embrión humano BOT, 21mm. Sección sagital. Hematoxilina-eosina. La condensación mesenquimal que rodea los acinos contiene, vasos (V) y nervios (flechas).

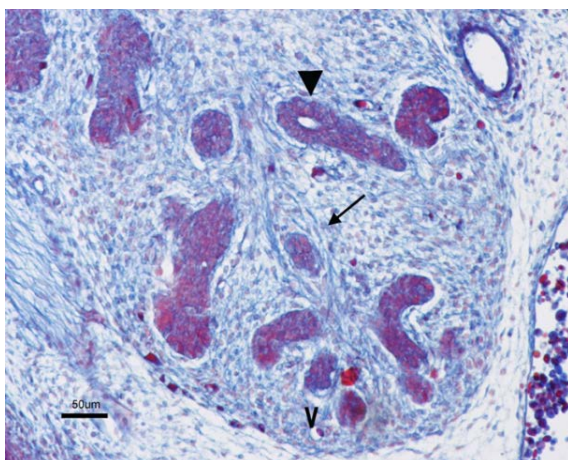
*Estadio 21*

El espécimen de este estadio muestra prácticamente las mismas características del estadio anterior, si bien los vasos que aparecen en la condensación mesenquimal son muy evidentes

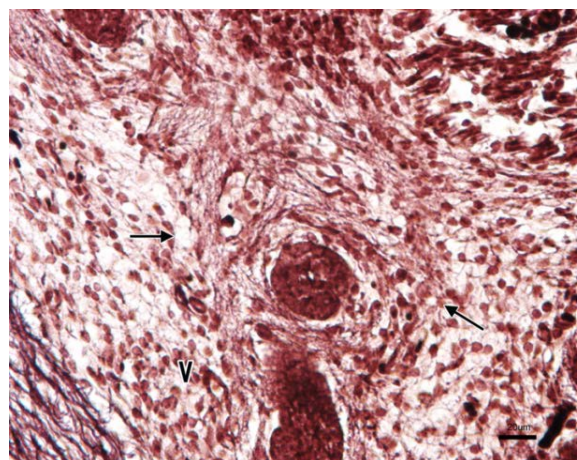
*Estadio 22*

Los especímenes de este estadio muestran cuatro características principales:

1. Las ramas nerviosas del complejo ganglioneural lingual alcanzan el esbozo de los acinos glandulares (figs. 32, 33).
2. El conducto excretor también muestra inervación, procedente del complejo ganglioneural (fig. 34).
3. Los acinos glandulares más proximales presentan luz (figs. 32, 33).
4. El esbozo glandular alcanza su posición topográfica definitiva, en la región suprahioidea lateral (figs. 35, 36).

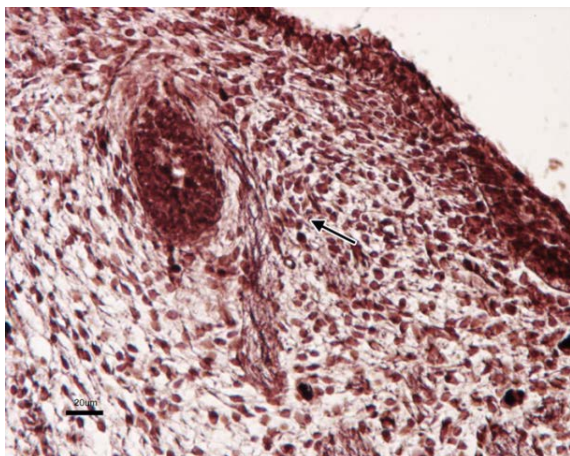


**Fig. 32.-** Embrión humano GI4, 26,5 mm. Sección frontal. Azán. Ramas nerviosas rodean los acinos glandulares (**flecha**). En la parte proximal de los acinos aparece luz (**cabeza de flecha**). Vasos (V).

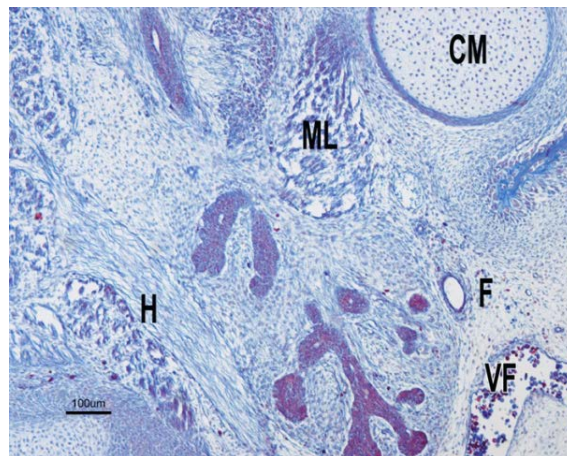


**Fig. 33.-** Embrión humano PT10, 26mm. Sección frontal. Bielschowsky. Ramas nerviosas rodean los acinos proximales con luz (**flechas**). Vasos (V).

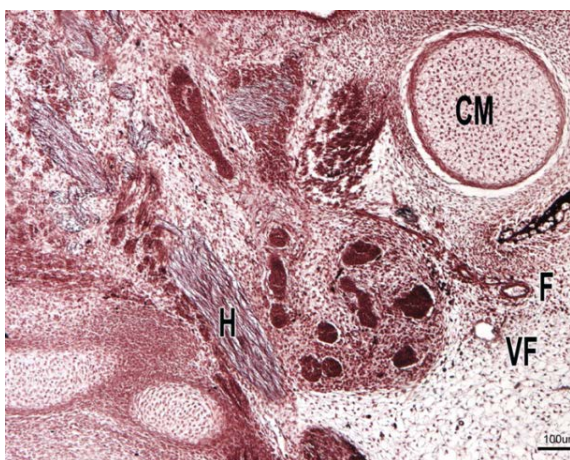




**Fig. 34.-** Embrión humano PT10, 26 mm. Sección frontal. Bielschowsky. Corte frontal. Rama nerviosa alcanza el conducto excretor glandular (flecha).



**Fig. 35.-** Embrión humano GI4, 26,5 mm. Sección frontal. Azán. Región suprahioidea lateral. Los acinos proximales presentan luz. El esbozo glandular se relaciona con la vena (VF) y arteria facial (F), nervio hipogloso (H), músculo milohioideo (ML) y cartílago de Meckel (CM).

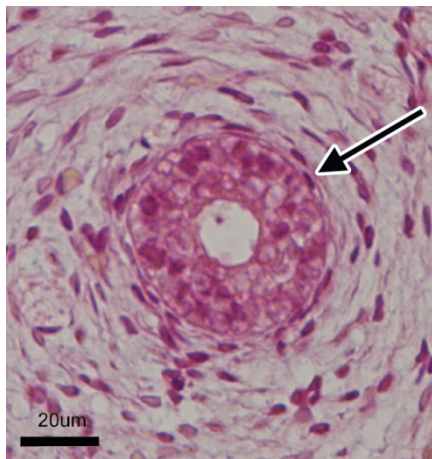


**Fig. 36.-** Embrión humano PT10, 26 mm. Sección frontal. Bielschowsky. El esbozo glandular alcanza su posición topográfica definitiva. Nervio hipogloso (H). Arteria facial (F). Vena facial (VF). Cartílago de Meckel (CM).

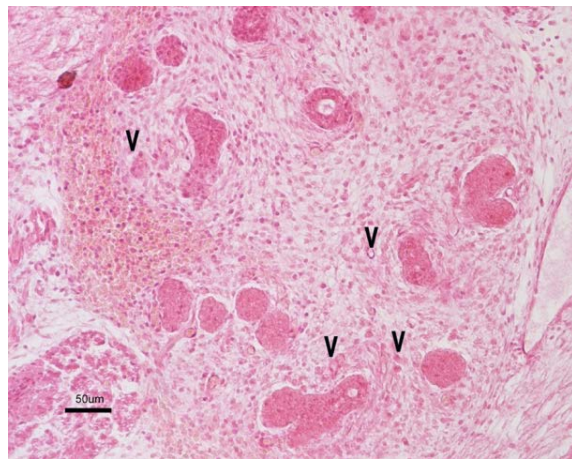
*Estadio 23*

Un hecho destaca durante este estadio, la presencia de unas células de forma fusiforme que rodean el conducto excretor y que corresponden al esbozo de las células mioepiteliales (fig. 37), estas células están en relación con la membrana basal del conducto.

El esbozo glandular muestra mayor complejidad e incrementa su vascularización, si bien aún la parte distal de los acinos glandulares no existe luz (fig. 38).



**Fig. 37.-** Embrión humano BR, 28 mm., Sección frontal. Hematoxilina-eosina. Esbozo células mioepiteliales (**flecha**).



**Fig. 38.-** Embrión humano BR, 28 mm., Sección frontal. Hematoxilina-eosina. Numerosos vasos en el esbozo glandular (**V**).

**Tabla VIII: Resumen de los eventos durante el desarrollo de la glándula en embriones humanos**

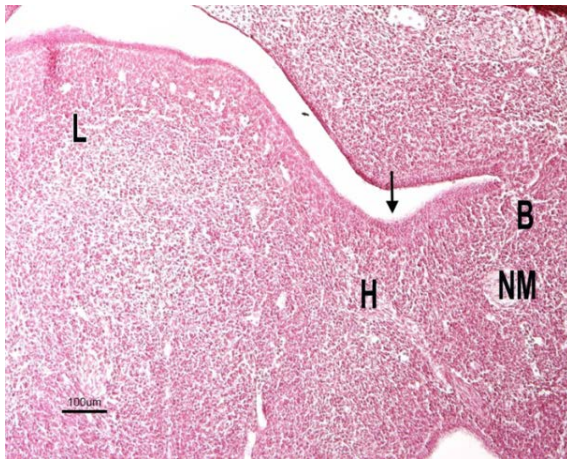
Estadio Carnegie	Evento
16	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aparición del surco paralingual medial.</li> <li>• Condensación epitelial (placoda) con nítida membrana basal que le separa del mesénquima condensado en zona ganglioneural.</li> </ul>
17	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aparición del surco paralingual lateral.</li> <li>• En la zona placodial del surco paralingual medial, los núcleos celulares se polarizan hacia la cavidad bucal con el mesénquima subyacente condensado.</li> <li>• Invaginación del epitelio hasta alcanzar el complejo ganglioneural en un espécimen (G1-2, 12,5mm).</li> </ul>
18	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Invaginación del epitelio sin luz y rodeado de mesénquima condensado.</li> <li>• Ramas del complejo ganglioneural lingual hacia mesénquima que rodea epitelio invaginado.</li> <li>• Epitelio invaginado empieza a ramificarse al alcanzar el complejo ganglioneural lingual.</li> </ul>
19	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epitelio invaginado sin luz comienza a organizarse. Dorsal al complejo ganglioneural lingual ramificación más compleja.</li> <li>• Mesénquima que rodea epitelio invaginado más condensado distalmente.</li> <li>• Ramas del complejo ganglioneural lingual en el interior del mesénquima condensado.</li> </ul>
20 21	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aparece papila sublingual.</li> <li>• Conducto excretor con luz</li> <li>• Mesénquima se organiza alrededor del conducto excretor.</li> </ul>
22	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ramos nerviosos alcanzan esbozo de acinos glandulares y conducto excretor.</li> <li>• Porción proximal de acinos glandulares presenta luz.</li> <li>• El esbozo glandular alcanza su posición topográfica definitiva.</li> </ul>
23	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esbozo de células mioepiteliales en el conducto excretor</li> </ul>



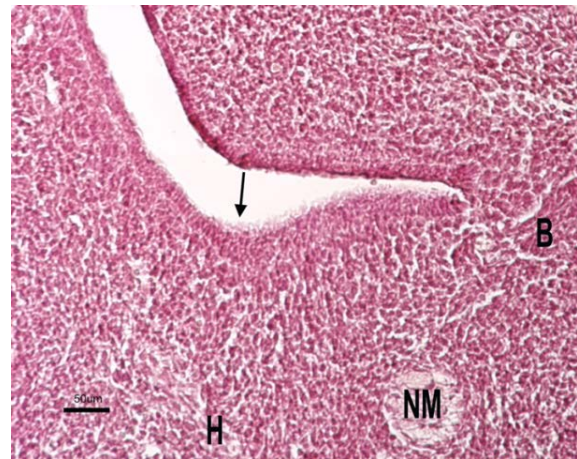
## RESULTADOS ESPECIMENES RATA

*E14*

En embriones del estadio 14 (E14) comienza a elevarse el esbozo de la lengua que está formada por mesénquima indiferenciado. Lateral al relieve lingual aparece el epitelio discretamente engrosado, esbozándose el surco paralingual medial (figs. 39, 40). El mesénquima subyacente aparece condensado.



**Fig. 39.-** Espécimen de rata E14. Sección frontal. Hematoxilina-eosina. Lengua (L). Nervio hipogloso (H). Nervio mandibular (NM). Nervio bucal (B). Surco paralingual medial (flecha).

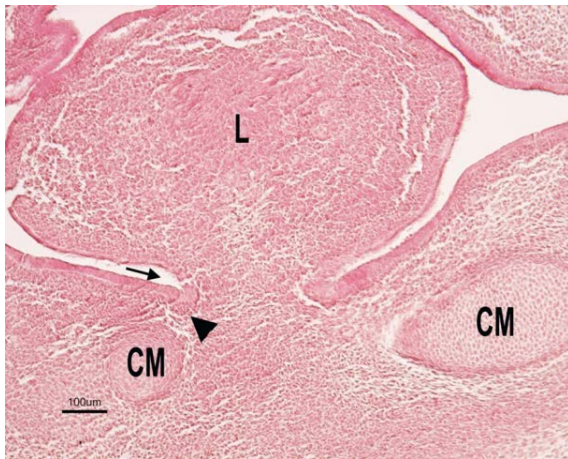


**Fig. 40.-** Aumento de la figura anterior. Nervio hipogloso (H). Nervio mandibular (NM). Nervio bucal (B). Surco paralingual medial (flecha).

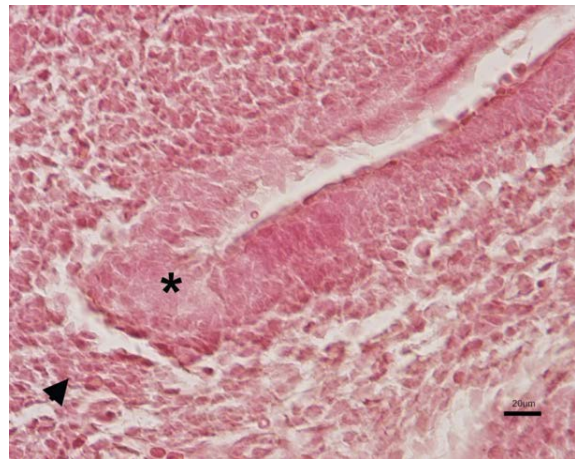
El nervio hipogloso se dirige hacia el esbozo lingual, mientras que el nervio mandibular queda a distancia del epitelio del suelo de la boca separado de él por mesénquima. El fondo del surco transversal de la boca primitiva se relaciona con el nervio bucal.

*E15*

En embriones E15, podemos observar como en las secciones más anteriores de la boca, a nivel del futuro frenillo lingual, se visualiza el surco paralingual medial. Este muestra un engrosamiento evidente del epitelio y el mesénquima subyacente aparece discretamente condensado (figs. 41, 42).

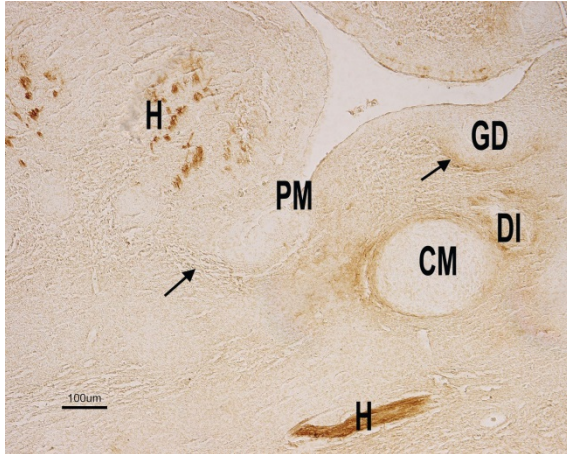


**Fig. 41.-** Espécimen de rata E15. Sección frontal. Hematoxilina-eosina. El surco paralingual medial (**flecha**) muestra un evidente engrosamiento epitelial. Cartílago de Meckel (**CM**). Lengua (**L**). Mesénquima condensado (**cabeza de flecha**).

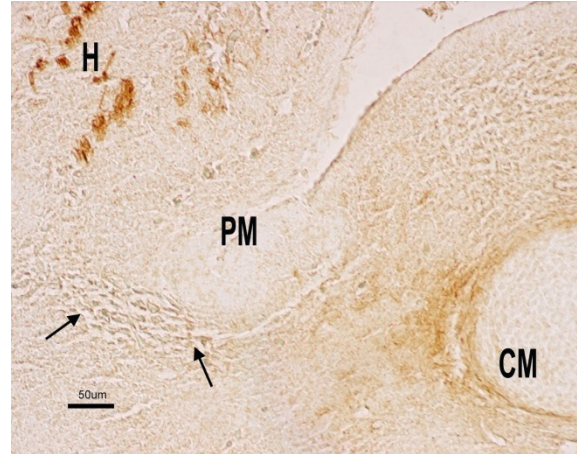


**Fig. 42.-** Aumento de la figura anterior. Engrosamiento epitelial (placoda) (\*). Condensación mesenquimal (**cabeza de flecha**).

Las secciones tratadas con NHK-1 mostraron marcaje positivo en el mesénquima subyacente. De igual modo, se marcó positivamente el mesénquima que rodea el esbozo epitelial de los dientes (figs. 43, 44).



**Fig. 43.-** Embrión de rata E15. Sección frontal. Patrón de inmunoreactividad positiva para NHK-1. Nervio hipogloso (**H**). Cartílago de Meckel (**CM**). Surco paralingual medial (**PM**). Condensación mesenquimal con marcaje positivo (**flechas**) a nivel del surco paralingual medial y del germen dentario (**GD**). Nervio dentario inferior (**DI**).



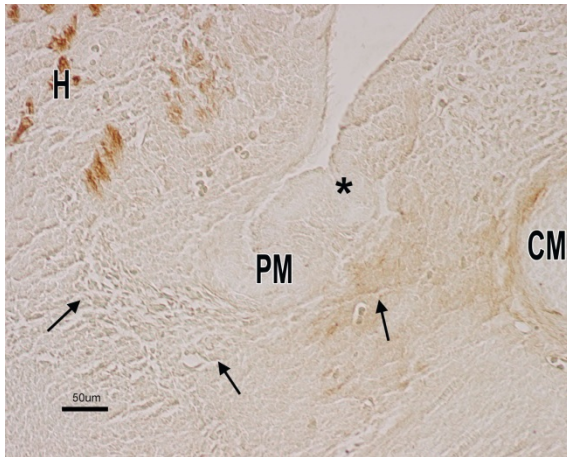
**Fig. 44.-** Aumento de la figura anterior. Nervio hipogloso (**H**). Cartílago de Meckel (**CM**). Surco paralingual medial (**PM**). Condensación mesenquimal subyacente al surco paralingual medial con marcaje positivo para NHK-1 (**flechas**).

En secciones posteriores se observa la invaginación del epitelio condensado del surco paralingual medial y lateral (Figs. 47, 49 y 50).

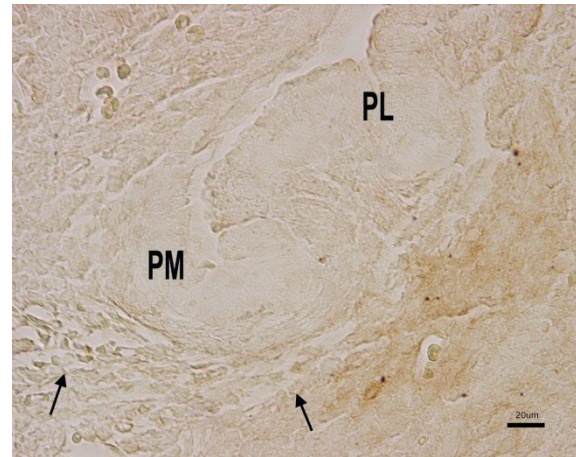
Además como control positivo se aprecia el claro e intenso marcaje del cartílago de Meckel así como los nervios dentario inferior e hipogloso.

La luz del surco paralingual medial invaginado conecta con la luz de la cavidad bucal. El mesénquima subyacente aparece con marcaje positivo para NHK-1 (figs. 45, 46).



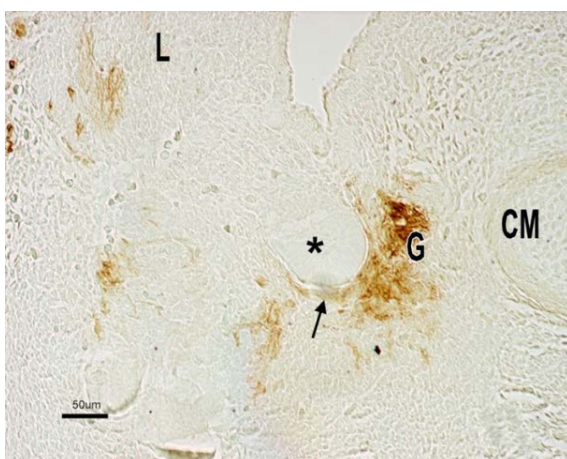


**Fig. 45.-** Embrión de rata E15. Sección frontal. Patrón de inmunoreactividad positiva para NHK-1. El epitelio engrosado del surco paralingual medial se invagina. El mesénquima subyacente al surco aparece con marcaje positivo para NHK-1 (**flechas**). Lateral al surco paralingual medial (**PM**) se esboza el surco paralingual lateral (\*). Nervio hipogloso (**H**). Cartílago de Meckel (**CM**).

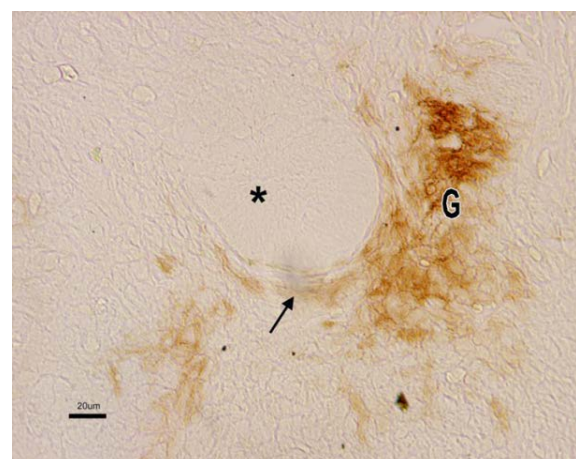


**Fig. 46.-** Aumento de la figura anterior. Surco paralingual medial (**PM**). Surco paralingual lateral (**PL**). Mesénquima con marcaje positivo para NHK-1 (**flechas**).

La parte distal de la invaginación epitelial es un cordón epitelial sólido, que no tiene luz en su interior; se relaciona con el ganglio parasimpático lingual y el mesénquima subyacente. Ambos elementos muestran un marcaje positivo con NHK-1 (figs. 47, 48).

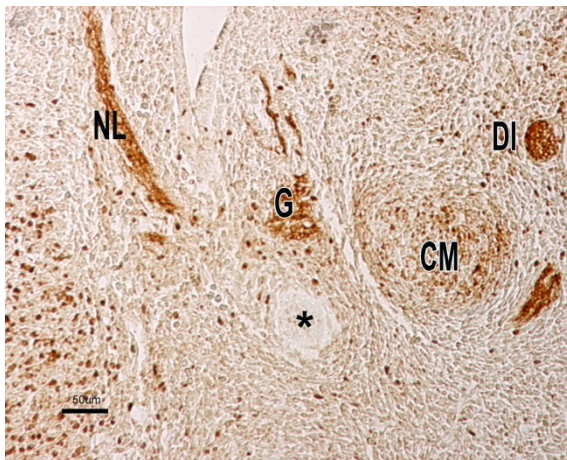


**Fig. 47.-** Embrión de rata E15. Sección frontal. Patrón de inmunoreactividad positivo para NHK-1. Ganglio parasimpático lingual (**G**). Cordón epitelial sólido (\*). Lengua (**L**). Mesénquima subyacente al cordón epitelial que expresa NHK-1 (**flecha**). Cartílago de Meckel (**CM**).

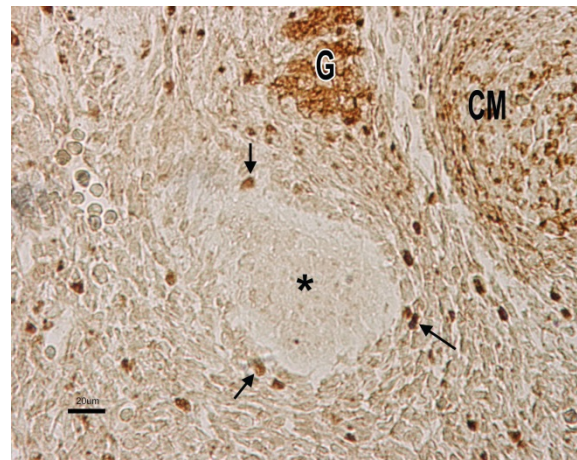


**Fig. 48.-** Aumento de la figura anterior. Cordón epitelial sólido (\*). Ganglio parasimpático lingual (**G**). Mesénquima subyacente al cordón epitelial que expresa NHK-1 (**flecha**).

Algunas células próximas a la parte distal de la invaginación mostraron marcaje positivo para NF200; de igual modo el ganglio parasimpático lingual y el nervio lingual aparecen con inmunoreactividad positiva (figs. 49, 50).



**Fig. 49.-** Embrión de rata E15. Sección frontal. Patrón de inmunoreactividad positivo para NF200. Los nervios lingual (NL) y dentario inferior (DI), expresan positividad para NF200. El cordón epitelial sólido (\*) es negativo. Cartílago de Meckel (CM). Ganglio parasimpático lingual (G).



**Fig. 50.-** Embrión de rata E15. Sección frontal. Patrón de inmunoreactividad positivo para NF200. Algunas células próximas (flechas) al cordón epitelial sólido (\*) expresan el marcaje con NF200. Ganglio parasimpático lingual (G). Cartílago de Meckel (CM).

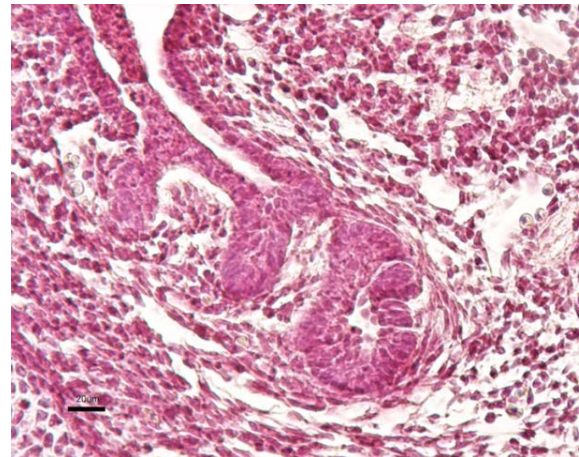
### E16-17

Durante estos estadios algunos especímenes mostraban en la parte rostral, en conexión con el suelo de la boca, una formación epitelial cordonal con luz (figs. 51, 52). Sin embargo, a la altura del complejo ganglioneural lingual esta formación epitelial se muestra sólida y sin luz (fig. 53). Además durante estos estadios el mesénquima que rodea al epitelio invaginado no mostraba inmunoreactividad al NHK-1.

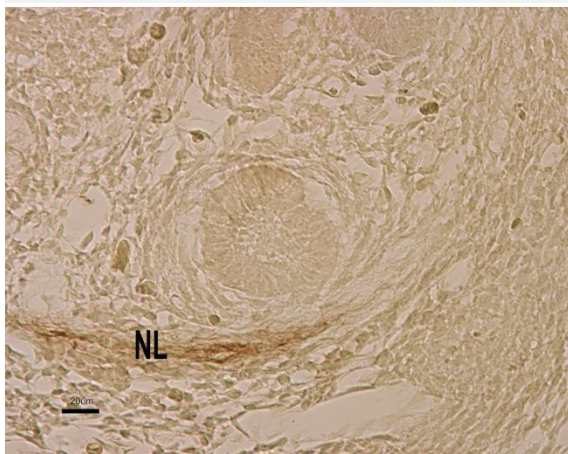




**Fig. 51.-** Embrión de rata E16. Sección frontal. Hematoxilina-eosina. La sección muestra el epitelio invaginado de forma tubular (**flechas**). Lengua (**L**). Músculo geniogloso (**GE**). Cartílago de Meckel (**CM**).



**Fig. 52.-** Aumento de la figura anterior.

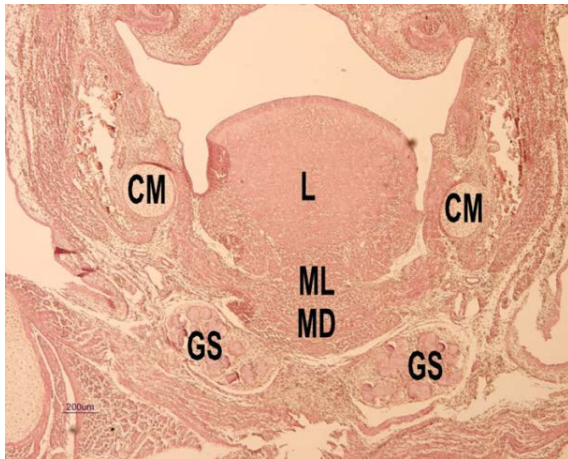


**Fig. 53.-** Embrión de rata E16. Inmunoreacción positiva para NHK-1. El cordón epitelial aparece sólido, relacionándose con el nervio lingual. El nervio lingual (**NL**) expresa NHK-1 positivamente.

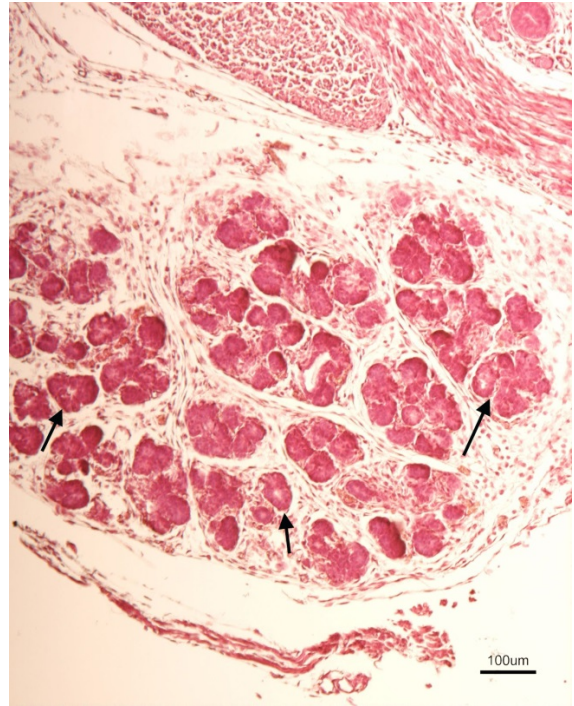
### *E18-19-20*

A partir del estadio 18, la glándula submandibular alcanza su localización definitiva, relacionándose con el músculo milohioideo (fig. 54).

Durante E18 el cordón epitelial sobrepasa el complejo ganglioneural lingual y los acinos comienzan a tener luz en su interior; si bien este proceso no alcanza la parte más distal (fig. 55).



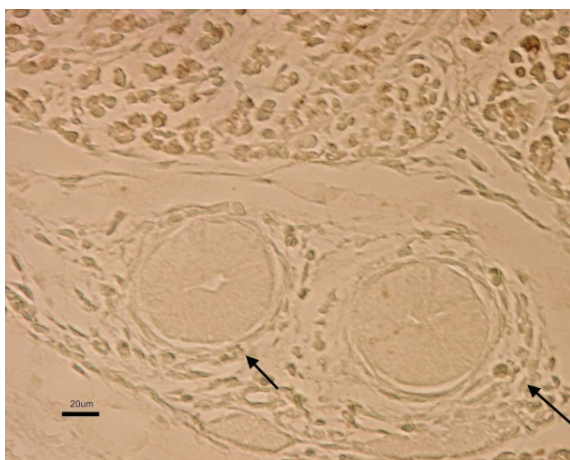
**Fig. 54.-** Embrión de rata E18. Sección frontal. Hematoxilina-eosina. El esbozo de la glándula salivar submandibular se localiza en su posición definitiva a partir de E18. Esbozo de la glándula submandibular (**GS**). Músculo milohioideo (**ML**). Cartílago de Meckel (**CM**). Lengua (**L**). Músculo digástrico (**MD**).



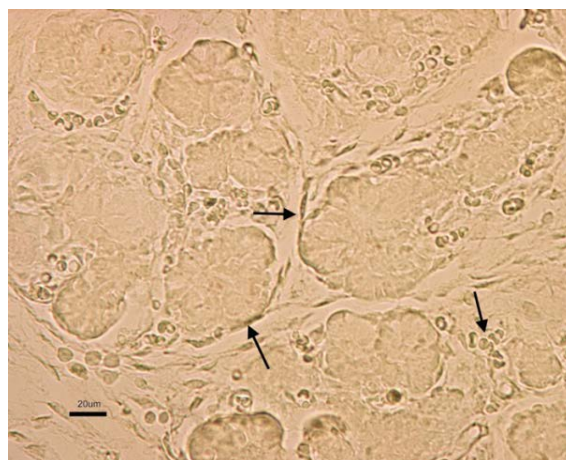
**Fig. 55.-** Embrión de rata E18. Sección frontal. Hematoxilina-eosina. Los acinos en su parte distal presentan luz (**flechas**).

El mesénquima que rodea los conductos excretores submandibular y sublingual, muestra inmunoreactividad positiva para NHK-1 (fig. 56) al igual que le ocurre a la cápsula mesenquimal submandibular (fig. 57).





**Fig. 56.-** Embrión de rata E18. Sección frontal. Los conductos excretores submandibular y sublingual, con luz, se relacionan con células mesenquimales que expresan NHK-1 (**flechas**).



**Fig. 57.-** Embrión de rata E18. Sección frontal. La cápsula de la glándula submandibular expresa NHK-1 (**flechas**).

**Tabla IX: Resumen del desarrollo de la glándula en embriones de rata**

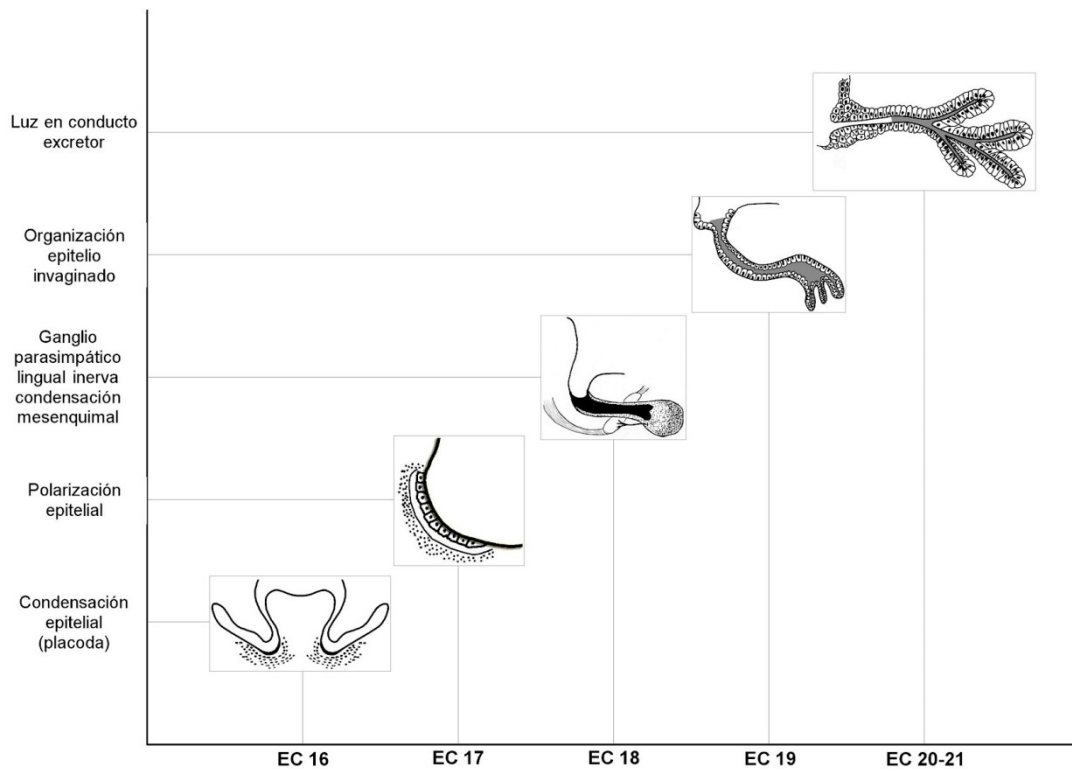
Estadio	Evento
E 14	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esbozo del surco paralingual medial y engrosamiento del epitelio a ese nivel condensación mesenquimal subyacente.</li> </ul>
E 15	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Engrosamiento muy evidente del epitelio del surco paralingual medial y condensación del mesénquima subyacente.</li> <li>• Invaginación del epitelio formando un cordón sólido unido al epitelio de la cavidad oral</li> <li>• La parte distal de la invaginación está rodeada por mesénquima condensado y se relaciona con el ganglio parasimpático lingual. Ambas estructuras muestran marcaje positivo a NHK-1 y NF200</li> </ul>
E16, E17	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aparece luz en la porción inicial del cordón epitelial.</li> <li>• El mesénquima no muestra inmuno reactividad al NHK-1</li> </ul>
E 18, 19 y 20	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La glándula alcanza su localización definitiva</li> <li>• Comienza a verse luz en el interior de los acinos</li> <li>• El mesénquima que rodea los conductos excretores submandibular y sublingual muestra inmunoreactividad positiva para NHK-1</li> <li>• La cápsula mesenquimal de la glándula muestra inmunoreactividad positiva al NHK-1</li> </ul>

## DISCUSIÓN

Nuestras observaciones permiten identificar 5 fases durante el periodo embrionario en humanos (representación esquemática):

1. Fase de condensación epitelial (placoda) en el surco paralingual medial, durante el EC16.
2. Fase de polarización epitelial (EC17) e invaginación epitelial comenzando la ramificación epitelial al alcanzar el complejo ganglioneural lingual (EC18).
3. Fase de organización del epitelio invaginado (EC19).
4. Fase de luz o canalización en el conducto excretor (EC20-21).
5. Fase de luz en los acinos glandulares proximales e inervación de los acinos. Topografía glandular definitiva (EC22).

Aunque son pocos los investigadores que han analizado el desarrollo de la glándula submandibular en embriones humanos, la mayoría de los autores describen el inicio del desarrollo de la glándula como una condensación del epitelio del surco paralingual medial durante la 6<sup>a</sup>-7<sup>a</sup> semana del desarrollo, EC17-18 (tabla I). Sin embargo nuestros resultados muestran la condensación epitelial (placoda) en el surco paralingual medial en embriones del EC16, final de la 5<sup>a</sup> semana del desarrollo, coincidiendo con lo descrito por Thoma (1919).



Representación esquemática de las fases de desarrollo de la glándula submandibular humana durante el periodo embrionario

Por otro lado, coincidimos con Mérida Velasco y cols. (1993) al señalar que el surco paralingual medial aparece antes que el paralingual lateral. Estos hallazgos no apoyan las conclusiones de Velázquez Santana (1952) y Orts Llorca (1985) que describieron tres surcos o estrías en el suelo de la boca, medial, intermedia y lateral. Estos autores consideraron que a partir de estos surcos se originan las glándulas salivares submandibular, sublingual mayor y sublingual menor respectivamente.

El mesénquima subyacente a la zona placodial aparece condensado y a cierta distancia se localiza el complejo ganglioneural lingual.

En embriones de rata E14 aparece el surco paralingual medial a ambos lados del esbozo de la lengua formada por mesénquima indiferenciado. El

epitelio del surco paralingual medial y el mesénquima subyacente aparecen condensados, mostrando un patrón parecido al del embrión humano del estadio 16 de la Carnegie. Nuestros resultados coinciden con las descripciones de Denny y cols. (1997) en ratas. En ratones se describen estos procesos en embriones del E11.5 (Jaskoll y Melnick, 1999). Esta fase corresponde a la descrita como prebrote.

El mesénquima condensado subyacente a la placoda epitelial a nivel del surco paralingual medial, en ratas del E15, muestra positividad para NHK1, lo que sugiere un origen neurocrestal (Morris-Kay y cols. 1993; Ericsson y Perris, 1993; Baroffio y cols. 1998). Chai y Maxson (2006) indicaron que el mesénquima que interacciona con el ectodermo de la boca durante la morfogénesis del diente es de origen neurocrestal. Recientemente Mérida Velasco y cols. (2012) señalaron que el órgano yuxtaoral se desarrolla a partir de una condensación epitelial localizada en el fondo del surco transversal de la boca primitiva durante el E14 en rata relacionándose con un mesénquima subyacente, positivo NHK1, y por tanto de origen neurocrestal.

Recientemente Pattel y Hoffman (2013), en un trabajo de revisión, señalaron que interacciones recíprocas entre el epitelio y el mesénquima de origen neurocrestal, los nervios y los vasos, regulan los estadios iniciales del desarrollo de la glándula submandibular. No se conocen las señales que hacen que las células de la cresta neural migren para formar condensaciones mesénquimales en lugares específicos subyacentes al epitelio oral.

Durante el E17 de la Carnegie, en embriones humanos hay dos importantes cambios morfológicos en el suelo de la boca. Por un lado, aparece el surco paralingual lateral, por otro la condensación epitelial (placoda) del surco paralingual medial muestra una polarización de los núcleos celulares hacia la luz de la cavidad bucal. Una clara membrana basal separa la placoda del mesénquima condensado subyacente. La polarización de los núcleos

aparece menos acentuada dorsalmente, a la altura del complejo ganglioneural lingual. Esta fase del desarrollo no ha sido descrita por ningún autor. Para nosotros, este cambio morfológico señala el área prospectiva de la papila salivar sublingual, desembocadura del conducto excretor submandibular. Serrano Cuenca (1983) señalaron que durante este estadio aparecía un área clara, continua y acelular, que separaba la membrana basal epitelial del mesénquima periambiental. Para estos autores este sería el estadio inicial de la formación capsular. La importancia de la membrana basal durante el desarrollo de la glándula submandibular ha sido puesta de manifiesto por numerosos trabajos experimentales que han demostrado, en ratones y ratas en las fases iniciales del desarrollo glandular, una clara y evidente membrana basal que separa el epitelio del mesénquima subyacente. Además la membrana basal parece ser un factor importante para el proceso de ramificación glandular (Cutler y Chaundry, 1974; Kadoya y Yamashina, 2005).

Un espécimen del EC17 (Gi2 12,5mm GL) mostraba el comienzo de la invaginación epitelial. En todos los especímenes del EC18 el epitelio invaginado alcanzaba el complejo ganglioneural lingual. Serrano Cuenca (1983) y Rodríguez Vázquez y cols. (1984) describen el proceso de invaginación durante el EC17 (embriones de 12mm. GL), Arráez Aybar (1991) (embriones de 13 mm EC17), en dirección caudo-latero-dorsal; Mérida Velasco y cols. (1993) lo describen durante el EC20.

Tres hechos son relevantes durante EC18:

1. Al alcanzar el epitelio invaginado el ganglio parasimpático lingual, comienza la ramificación epitelial.
2. La condensación mesenquimal se dispone rodeando al epitelio invaginado y dorsal al mismo.
3. A partir del complejo ganglioneural lingual emergen ramas nerviosas hacia el mesénquima condensado.

Velázquez Santana (1952) señaló el comienzo de la ramificación en embriones humanos de 21mm. GL; Serrano Cuenca (1983) señaló que en embriones humanos de 19mm. GL existe un discreto proceso de bilobulación. Para Mérida Velasco y cols. (1993) la glándula submandibular comienza su ramificación durante el EC21; para Thoma (1919) este proceso se inicia al final del periodo embrionario (8ª semana del desarrollo) mientras que El-Mohandes y cols. (1987) señalan que la lobulación glandular se produce entre la 9ª y 12ª semana del desarrollo.

Nosotros creemos que es a partir del momento en el que el esbozo glandular alcanza el complejo ganglioneural lingual y recibe innervación, cuando comienza el proceso de ramificación glandular. Pattel y Hoffman (2013) señalaron que el proceso de ramificación y la llegada de axones procedentes del ganglio parasimpático submandibular son sincrónicos, apareciendo en ratones pertenecientes a E13. No hemos encontrado en la literatura referencias de la innervación del mesénquima que rodea al epitelio invaginado a partir del complejo ganglioneural lingual, durante el EC18 en humanos. Dozin (1966) lo señaló en un esquema de un embrión de 20 mm GL. Indicando que el ganglio submandibular y el mesénquima condensado condicionan la morfogénesis glandular. Serrano Cuenca (1983) señaló que en embriones de 12-13mm. GL se establece la relación entre la invaginación epitelial y el complejo ganglioneural, pero no observa la innervación a partir de dicho complejo. Mérida Velasco y cols. (1993) señalaron que durante los EC 21 y 22, la glándula submandibular estaba innervada por los nervios secretorios del ganglio submandibular, sin embargo no muestran imágenes de esta innervación. Gibson (1983) en su estudio sobre el desarrollo de la glándula submandibular en fetos de 13,5 a 16 semanas de desarrollo evidenció innervación de la glándula mediante microscopía electrónica.

Recientemente Knox y cols. (2010) en su estudio en ratones, se centran en el análisis del papel inductivo del ganglio parasimpático submandibular en el



desarrollo de la glándula submandibular. En experimentos de recombinación de epitelio y mesénquima con y sin ganglio parasimpático submandibular, muestran que en ausencia del ganglio, la expresión de marcadores de células progenitoras epiteliales (Krt5, Krt15, aquaporina3) disminuye. Parece ser que la expresión de estos marcadores depende de la señalización de acetilcolina a través del receptor muscarínico M1 y de las señales de EGFR. Parece por tanto, que la innervación parasimpática mantiene la población de progenitores epiteliales en un estadio indiferenciado durante la morfogénesis glandular. En contraste, el papel de la innervación simpática no parece afectar al desarrollo de la glándula submandibular. Ryu y cols. (2013) actuando sobre la innervación simpática de la glándula submandibular, no observaron defectos en el desarrollo de la glándula submandibular.

Nosotros creemos que la innervación observada en esta fase es de gran importancia ya que la innervación a partir del complejo ganglioneural podría marcar durante el desarrollo en humanos los dos territorios glandulares, esto es, a partir del ganglio y su innervación se desarrolla la glándula propiamente dicha, mientras que proximalmente el epitelio invaginado dará lugar al conducto excretor.

Arráez Aybar (1991) no describe la innervación del epitelio invaginado aunque consideró que en un embrión de 18 mm. la porción de epiblasto invaginado localizado dorsal al complejo ganglio neural lingual corresponde a la futura glándula y la porción ventral a dicho complejo constituye el futuro conducto submandibular.

En los especímenes de rata E15, que corresponde al estadio de brote inicial (Denny y col. 1997), hemos comprobado que el epitelio se invaginaba en el mesénquima marcado positivamente con NHK-1 y de igual forma se marcaba el complejo ganglioneural lingual lo que sugiere un origen neurocrestal. El ganglio parasimpático lingual tiene un origen neurocrestal como ha sido señalado en humanos (Mayor y Theveneau, 2013), en aves

(Le Douarin y Tailler, 1974; DÁmico-Martell y Noden, 1983) y en mamíferos (Chai y cols., 2000; Pattel y Hoffman, 2013).

En humanos, O’Rahilly y Müller (2007) indicaron la participación de células de la cresta neural en el desarrollo del nervio trigémino.

Según nuestros resultados, embriones humanos de EC18, la condensación mesenquimal se localiza dorsal al epitelio invaginado y muestra signos de mayor condensación en la parte distal lo que contrasta con la porción proximal más cercana al suelo de la boca desde donde se invaginó. En la fase canalicular, tanto en ratón como en rata, se ha señalado que las células situadas en la zona interior sufren procesos apoptóticos, mientras que las células situadas en la periferia del futuro conducto aumentan los procesos proliferativos (Melnick y Jaskoll, 2000).

Para nosotros este resultado puede explicarse teniendo en cuenta que este mesénquima que influencia al epitelio invaginado, está derivado de la cresta neural y tiene capacidad migratoria (Morriss-Kay y cols., 1993; Ericsson y Perris, 1993; Baroffio y cols., 1998) por lo que posiblemente actúa dirigiendo al epitelio en dirección dorsal y lateral.

Serrano Cuenca (1983) indicó que la condensación del mesénquima situado por delante del esbozo glandular va a condicionar y dirigir el desarrollo del epitelio glandular ya que el mesénquima es determinante de la forma y crecimiento glandular. En el desarrollo de la glándula parótida se ha señalado que el mesénquima condensado condiciona el camino por donde ha de realizar su crecimiento y ulterior localización en la región parotídea (Sanz Casado y cols. 1983).

En el EC18 se observó el comienzo de la ramificación epitelial glandular al alcanzar el complejo ganglioneural lingual. El proceso de ramificación glandular está condicionado por numerosos factores (ver introducción).

Durante el EC19 se observó la organización de las células epiteliales previamente a la aparición de luz en los conductos excretores. Esta fase no ha sido descrita en humanos por ningún autor.

Nuestros resultados señalan la aparición de luz en el conducto excretor durante el EC20-21, coincidiendo con la aparición del esbozo de la papila salival sublingual. El proceso de formación de luz en el conducto se realiza en dirección próximo-distal, es decir desde el lugar de origen placodial, hacia los acinos glandulares, coincidiendo con lo descrito por Arráez Aybar (1991). Durante estos estadios no hay luz en los acinos glandulares. Similares resultados obtenemos en embriones de rata E16-17 (fase canalicular).

Rodríguez Vázquez y cols. (1984) señalaron que el inicio del proceso de canalización aparecía en embriones de 17mm. GL, en la porción distal del epitelio invaginado. Sin embargo, Serrano Cuenca (1983), Arráez Aybar (1991) y Mérida Velasco y cols. (1993) señalaron que aparecía luz en el extremo proximal del conducto excretor en embriones de los estadios EC20-22.

Otro hecho relevante observado en esta etapa es la llegada de elementos vasculares al mesénquima que rodea el epitelio ramificado, esbozo del parénquima glandular. Esto ya fue descrito por Serrano Cuenca (1983).

De acuerdo con Mérida Velasco y cols. (1993), durante el EC22, la glándula alcanza su posición topográfica definitiva en la región suprahioidea lateral, apoyándose sobre la cara lateral del músculo milohioideo y ocupando el ángulo delimitado entre este músculo y la mandíbula en desarrollo, relacionándose con la arteria facial. En embriones de rata de E18-20 la glándula submandibular alcanza su topografía definitiva.

En resumen nuestro estudio permite sistematizar el desarrollo de la glándula submandibular en humanos en 5 fases:

1. Fase presuntiva glandular o fase de condensación epitelial (placoda) (EC16).
2. Fase de polarización epitelial (EC17), invaginación e inervación comenzando la lobulación (EC18).
3. Fase de organización del epitelio invaginado (EC19).
4. Fase de luz del conducto excretor (EC 20-21).
5. Fase de topografía definitiva (EC22).

Para nosotros, la glándula submandibular se desarrolla a partir del área presuntiva localizada en la condensación (placoda) epitelial del surco paralingual medial, que está acompañada de una condensación mesenquimal subyacente. En embriones de rata del E14-15 hemos comprobado que el mesénquima demuestra positividad al NHK-1, lo cual sugiere un origen neurocrestal. La zona de origen epitelial queda marcada durante el EC17 en humanos mediante un cambio morfológico de las células que la constituyen, la polarización de los núcleos celulares, marcando la zona presuntiva del orificio excretor.

Durante el EC18 se produce la invaginación epitelial. Este proceso tiene dos elementos importantes, el primero es el mesénquima subyacente que puede condicionar la invaginación del epitelio mediante un proceso de interacción epitelio mesénquima. Además, debido a las características migratorias de las células mesenquimales derivadas de la cresta neural, estas vehiculizan al epitelio invaginado hacia el complejo parasimpático del ganglio submandibular anexo al nervio lingual. En embriones de rata hemos comprobado la positividad al HNK-1 y NF200 de las células mesenquimales, refrendando un posible origen a partir de la cresta neural.

Durante este estadio se observó la inervación del mesénquima a partir del complejo ganglioneural lingual, coincidiendo con el comienzo del proceso de lobulación del epitelio. Este proceso es de gran importancia pues permite definir la parte de la invaginación epitelial que será conducto y que quedará rostral o ventral al ganglio; y la parte que formará la glándula propiamente

dicha, que será la que se relacione con el ganglio y se disponga dorsalmente hasta alcanzar su topografía definitiva (EC22) guiada por el mesénquima.

Hay que tener en cuenta además, el crecimiento en dirección ventral de las estructuras orales, como son la mandíbula y la lengua, que provoca un arrastre de la placoda epitelial en dirección ventral, fijando la desembocadura glandular a ambos lados del frenillo lingual.

## CONCLUSIONES

1. Hemos establecido 5 fases en el desarrollo de la glándula submandibular humana:
  - Fase de condensación epitelial o placoda, Estadio 16 de la Carnegie.
  - Fase de polarización epitelial, Estadio 17 de la Carnegie; invaginación y ramificación, Estadio 18 de la Carnegie.
  - Fase de organización epitelial, Estadio 19 de la Carnegie.
  - Fase de luz en el conducto excretor, Estadio 20-21 de la Carnegie.
  - Fase de topografía glandular definitiva, Estadio 22 de la Carnegie.
2. La placoda epitelial marca el lugar que ocupará la papila salival sublingual.
3. La glándula submandibular se origina a partir del epitelio del suelo de la boca que dará lugar al parénquima glandular y al conducto, y del mesénquima de origen neurocrestal que dará lugar a la cápsula o estroma glandular.
4. Las relaciones del esbozo glandular durante su desarrollo con el complejo ganglioneural lingual (ganglio parasimpático submandibular y nervio lingual) marcará que porción de la invaginación epitelial será la glándula propiamente dicha y cual el conducto excretor.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ARRAEZ AYBAR LA. Análisis morfo-diferenciativo del complejo epithelial submandibular. [Tesis Doctoral]. Madrid: Editorial Universidad Complutense; 1991.
2. BAROFFIO A, DUPIN E, LE DOURAIN NM. Common precursors for neural and mesectodermal derivatives in the cephalic neural crest. *Development*.1991; 112: 301-305.
3. BORGHESE E. The development *in vitro* of the submandibular and sublingual glands of Musculus. *J Anat*.1950; 84: 287-302.
4. BRUCE M CARLSON. Embriología Humana y Biología del Desarrollo 4ª edición. Mosby, Inc., Elsevier. 2009. Barcelona. España.
5. CHAI Y, JIANG X, ITO Y, BRINGAS P JR, HAN J, ROWITCH DH, SORIANO P, MCMAHON AP, SUCOV HM. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*. 2000; 127: 1671-1679.
6. CHAI Y, MAXSÓN RE. Recent Advances in Craniofacial Morphogenesis. *Developmental Dynamics*.2006; 235: 2353-2375.

7. CHIEVITZ JH. Beitrage zur Entwicklungsgeschichte der Speicheldrüsen. Arch Anat Physiol.1885; 9: 401–436.
8. CUTLER LS, CHAUNDRY AP. Intercellular contact at the epithelial-mesenchymal interface during the prenatal development of the rat submandibular gland. Dev Biol.1973; 33: 229-240.
9. CUTLER LS, CHAUNDRY AP. Cytodifferentiation of the acinar cells of the rat submandibular gland. Dev Biol.1974; 41: 31-41.
10. CUTLER LS. Intercellular contacts at the epithelial-mesenchymal interface of the developing rat submandibular gland in vitro. J Embryol Exp Morphol.1977; Jun 39: 71-77.
11. CUTLER LS. The dependent and independent relationships between cytodifferentiation and morphogenesis in developing salivary gland secretory cells. Anat Rec.1980; Mar 196 (3): 341-347.
12. D'AMICO-MARTELL A, NODEN DM. Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia. American AMJ Anat.1983; 166: 445-468.
13. DE MOERLOOZE L, SPENCER-DENE B, REVEST J, HAJIHOSSEINI M, ROSEWELL I, DICKSON C. An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2(FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. Development.2000; 127: 483-492.
14. DENNY PC, BALL WD, REDMAN RS. Salivary Glands: A Paradigm for Diversity of Gland Development. Crit Rev Oral Biol Med.1997; 8(1): 51-75.



15. DOZIN A. Les Connexions du Ganglion Sous-maxillaire chez L´Embryon Humain. *Acta Anat.*1965; 61: 213-258.
16. DOZIN A. Intrduction a l´etude de la morphogenese des glandes sous-maxillaires et sublinguales chez l´embryon humain. *Arch Biol (Liege)*.1966; 77 (3): 459-610.
17. EL-MOHANDES E, BOTROS K, BONDOK A. Prenatal development of the human submandibular gland. *Acta Anat.*1987; 130: 213-218.
18. ERICSSON CA, PERRIS R. The role of cell-cell and cell-matrix interactions in the morphogenesis of the neural crest. *Developmental Biology*.1993; 159: 60-74.
19. FAWCET DW. Tratado de Histología. 12ª edición. Interamericana Mc Graw-Hill. 1995. Madrid. España.
20. FERREIRA JN, HOFFMAN MP. Interactions between developing nerves and salivary glands. *Organogenesis*. 2013; 9: 3, 199-205.
21. GARCIA GARCIA JD, MERIDA VELASCO JA, BARRANCO ZAFFRA RJ, ESPIN FERRA J, SANCHEZ MONTESINOS I. Development of the ductus submandibularis in the human submandibular gland. *Eur Arch Biol*.1991; 102: 1-7. (Citado por Guizetti B y Radlanski RJ, 1996).
22. GAUBERT-CRISTOL R, GODLEWSKI G. Identification of point scores at stage 23 in the rat according to the system of scoring in the human embryo. *Acta Anat.*1991; 141: 364-368.
23. GENESER F. Histología 3ª edición. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2002.

24. GIBSON MHL. The prenatal human submandibular gland: a histological, histochemical and ultraestructural study. *Anat Anz.*1983; 153: 91-105.
25. GILLOTEAUX J, AFOLAYAN A. Clarification of the terminology of the major human salivary glands: acinus and alveolus are not synonymous. *The Anatomical Record.*2014; 297: 1354-1363.
26. GÓMEZ DE FERRARIS ME, CAMPOS MUÑOZ A. *Histología y Embriología Bucodental.* Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 1999.
27. GROBSTEIN C. Analysis in vitro of the early organization of the rudiment of the mouse submandibular gland. *J Morph.*1953; 93: 19-44.
28. GUIZETTI B, RADLANSKI RJ. Development of the submandibular gland and its closer neighboring structures in human embryos and fetuses of 19-67 mm. *CRL. Ann Anat.*1996; 178: 509-514.
29. HAMILTON WJ, MOSSMAN HW. *Human Embryology.* Cambridge: Haffer and sons ltd.; 1972.
30. HAYASHI T, KOYAMA N, AZUMA Y, KASHIMATA M. Mesenchymal miR-21 regulates branching morphogenesis in murine submandibular gland in vitro. *Dev Biol.* 2011; 352: 299-307.
31. HISATOMI Y, OKUMURA K, NAKAMURA K, MATSUMOTO S, SATOH A, PAGANO K, YAMAMOTO T, ENDO F. Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from Mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages. *Hepatology.*2004; 39 (3): 667-675.
32. HOFFMAN MP, KIDDER BL, STEINBERG ZL, LAKHANI S, HO S, KLEINMAN HK, LARSEN M. Gene expression profiles of mouse submandibular gland development: FGFR1 regulates branching

morphogenesis in vitro through BMP- and FGF-dependent mechanisms. *Development*.2002; 129 (24): 5767-5778.

33. HSU JC, YAMADA KM. Salivary Gland Branching Morphogenesis. Recent Progress and Future Opportunities. *Int J Oral Sci*.2010; 2(3): 117-126.
34. IBER D, MENSHYKAU D. The control of branching morphogenesis. *Open Biol*. 2013; 3:130088.
35. JASKOLL T, CHOY HA, MELNICK M. Glucocorticoids, TGF-beta, and embryonic mouse salivary gland morphogenesis. *J Craniofac Genet Dev Biol*.1994; Oct-Dec; 14(4): 217-30.
36. JASKOLL T, MELNICK M. Submandibular gland morphogenesis: stage-specific expression of TGF-alpha/EGF, IGF, TGF-beta, TNF, and IL-6 signal transduction in normal embryonic mice and the phenotypic effects of TGF-beta2, TGF-beta3, and EGF-r null mutations. *Anat Rec*. 1999;Nov 1;256(3): 252-68.
37. JASKOLL T, ZHOU Y, TRUMP G, MELNICK M. Ectodysplasin receptor-mediated signaling is essential for embryonic submandibular salivary gland development. *The Anatomical Record*.2003; 271A, 2: 322–331.
38. JASKOLL T, ABICHAKER G, WITCHER D, SALA FG, BELLUSCI S, HAJIHOSSEINI MK, MELNICK M. FGF10/FGFR2b signaling plays essential roles during in vivo embryonic submandibular gland morphogenesis. *BMC Developmental Biology*.2005; 5:11.
39. KADOYA Y, KADOYA K, DURBEEJ M, HOLMVALL K, SOROKIN L, EKBLOM P. Antibodies against domain E3 of Laminin-1 Integrin  $\alpha 6$  subunit perturb branching epithelial morphogenesis of submandibular gland, but by different modes. *The J Cell Biol*.1995; 129(2), 521-534.

40. KADOYA Y, YAMASHINA S. Ultraestructure of the basement membrane and its precursor in developing rat submandibular gland as shown by alcian blue staining. *Cell Tissue Res.*1992; 268, 233-238.
41. KADOYA Y, YAMASHINA S. Salivary gland morphogenesis and basement membranas. *Anatomical Science International.*2005; 80: 71-79.
42. KASHIMATA M, GRESIK EW. Epidermal Growth Factor System Is a Physiological Regulator of Development of the Mouse Fetal Submandibular Gland and Regulates Expression of the  $\alpha 6$ -Integrin Subunit. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS.*1997; 208:149–161.
43. KASHIMATA M, SAYEED S, KA A, ONETTI-MUDA A, SAKAGAMI H, FARAGGIANA T, GRESIK EW. The ERK-1/2 signaling pathway is involved in the stimulation of branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands by EGF. *Dev Biol.*2000; 220: 183-196.
44. KASHIMATA M, GRESIK EW. Contemporary approaches to the study of salivary gland morphogenesis. *Eur J Morphol.*1996; 34 (3): 143-147. Review.
45. KNOX SM, LOMBAERT IM, REED X, VITALE-CROSS L, GUTKIND JS, HOFFMAN MP. Parasympathetic innervation maintains epithelial progenitor cells during salivary organogenesis. *Science.*2010; 329 (5999): 1645–1647.
46. KNOX SM, LOMBAERT IM, HADDOX CL, ABRAMS SR, COTRIM A, WILSON AJ. Parasympathetic stimulation improves epithelial organ regeneration. *Nat Commun.*2013; 4: 1494.
47. LARSEN WJ. Embriología Humana. 3ª edición. Madrid España: Churchill Livingstone. Elsevier Science; 2003.

48. LAWSON KA. The role of mesenchyme in the morphogenesis and functional differentiation of rat salivary epithelium. *J Embryol Exp. Morph.*1972; 27(3): 497-513.
49. LE DOUARIN DNM, TAILLET MA. Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neuroectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. *Dev Biol.*1974; 41(1): 162-84.
50. LOMBAERT IM, HOFFMAN MP. Epithelial Stem/Progenitor Cells in the Embryonic Mouse Submandibular Gland. *Front Oral Biol.*2010; 14: 90–106.
51. MAYOR R, THEVENEAU E. The neural crest. *Development.*2013; 140, 2247-2251.
52. MC MANUS JFA, MOWRY RW. Técnica Histológica. Traducción de la 3ª. Ed. Inglesa. Madrid: Atika, S.A.; 1968; 133-136.
53. MECKEL J. Lehrbuch der Anatomie. Citado por BARCIA GOYANES J en "Onomatología Anatómica Nova". Tomo IV. Valencia: Publicaciones Universidad de Valencia; 1978.
54. MELNICK M, JASKOLL T. Mouse submandibular gland morphogenesis is. A paradigm for embryonic signal processing. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*2000; 11, 199-215.
55. MELNICK M, CHEN H, ZHOU Y, JASKOLL T. Embryonic mouse submandibular salivary gland morphogenesis and the TNF/TNF-R1 signal transduction pathway. *The Anatomical Record.*2001; 262: 318-330.

56. MÉRIDA VELASCO JA, SANCHEZ MONTESINOS I, ESPIN FERRA J, GARCÍA GARCÍA S, GARCÍA GÓMEZ S, ROLDÁN SCHILLING V. Development of the human submandibular salivary gland. *J. Dent Res.*1993;72 (8), 1227-1232.
57. MÉRIDA VELASCO JR, DE LA CUADRA BLANCO C, MÉRIDA VELASCO JA. Development of the juxta-oral organ in rat embryo. *The Anatomical Record.*2012; 295:769–775.
58. MJÖR IA, FEJERSKOV O. *Embriología e Histología Oral Humana.* Barcelona España: Salvat Editores, S.A.; 1989
59. MOORE KL, PERSAUD TVN, TORCHIA MG. *Embriología Clínica* 9ª edición 2013, Barcelona. Saunders, Elsevier.
60. MORITA K, NOGAWA H. EGF-dependent lobule formation and FGF7-dependent stalk elongation in branching morphogenesis of mouse salivary epithelium in vitro. *Dev Dyn.* 1999; 215 (2):148-54.
61. MORRIS-KAY G, RUBERTE E, FUKIISHI Y. Mammalian neural crest and neural crest derivatives. *Ann Anat.*1993; 175: 501-507.
62. NOGAWA H, NIZUNO T. Mesenchymal control over elongating and branching morphogenesis in salivary gland development. *J Embryol Exp Morphol.*1981; 66:209-221.
63. NOGAWA H. Determination of the curvature of epithelial cell mass by mesenchyme in branching morphogenesis of mouse salivary gland. *J Embryol Exp Morphol.*1983; 73: 221-232.
64. O'RAHILLY R, MÜLLER F. *Human Embriology and Teratology* 3ª Editiond.NY, USA: Willey-Lias New York; 2001.

65. O'RAHILLY R, MÜLLER F. The development of the neural crest in the human. *J Anat.* 2007; 211: 335-351.
66. O'RAHILLY R, MÜLLER F. Developmental Stages in humans embryos: revised and new measurements. *Cells Tissues Organs.* 2010; Vol. 192 (2): 73-84.
67. OHUCHI H, HORI Y, YAMASAKI M, HARADA H, SEKINE K, KATO S, ITOH N. FGF10 Acts as a Major Ligand for FGF Receptor 2 IIIb in Mouse Multi-Organ Development. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2000; 277: 643–649.
68. ORTS LLORCA F. Anatomía Humana. Tomo III. 6ª edición. Barcelona: Editorial Científico Médica; 1986.
69. AMANO O, MIZOBE K, BANDO Y, SAKIYAMA K. Anatomy and Histology of Rodent and Human Major Salivary Glands. *Acta Histochem. Cytochem.* 2012; 45 (5): 241–250.
70. PATEL VN, REBUSTINI IT, HOFFMAN MP. Salivary gland branching morphogenesis. *Differentiation.* 2006; 74, 349-364.
71. PATEL VN, HOFFMAN MP. Salivary gland development: a template for regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2013; 1-13.
72. REBUSTINI IT, HOFFMAN MP. ECM and FGF-dependent assay of embryonic SMG epithelial morphogenesis: investigating growth factor/matrix regulation of gene expression during submandibular gland development. *Methods Mol Biol.* 2009; 522: 319-330.
73. RODRIGUEZ VAZQUEZ JF, MERIDA VELASCO JR, JIMENEZ COLLADO J. Estadios iniciales de la morfogénesis de la glándula submandibular. *Trab Inst Embriol.* 1983; 1(3): 19-36.

74. RODRÍGUEZ VAZQUEZ JF, CABAÑAS ARMESILLA MD, MÉRIDA VELASCO JR, SANZ CASADO JV. Sistematización de la glándula submandibular. Trab Inst Embriol. 1984; 2: 1-13.
75. ROTHOVA M, THOMPSON H, LICKERT H, TUCKER AS. Lineage tracing of the endoderm during oral development. Dev Dyn. 2012; 241(7): 1183-1191.
76. RYU YK, COLLINS SE, HO HY, ZHAO H, KURUVILLA R. An autocrine Wnt5a-Ror signaling loop mediates sympathetic target innervation. Dev Biol. 2013;377: 79-89.
77. SAKAI T, LARSEN M, YAMADA KM. Fibronectin requirement in branching morphogenesis. Nature. 2003;423: 876-881.
78. SANZ CASADO JV, MÉRIDA VELASCO JR, JIMÉNEZ COLLADO J. Desarrollo temprano de la glándula parótida. Trab Inst Embriol. 1983; 1: 34-45.
79. SERRANO V. Horario morfogenico de la glandula submandibular. Embriones humanos de 12 a 25 mm. Estadios 17 a 22 de O´Rahilly. [Tesis Doctoral]. Madrid: 1983.
80. STANDRING S. Gray´s Anatomy. Churchill Livingstone, 40 edición. 2008, Elsevier Limited.
81. STEINBERG Z, MYERS C, HEIM VM, LATHROP CA, REBUSTINI IT, STEWART JS. FGFR2B signaling regulates ex vivo submandibular gland epithelial cell proliferation and branching morphogenesis. Development. 2005; 132: 1223–1234.
82. THESLEFF I, MIKKOLA ML. Death receptor signaling giving life to ectodermal organs. Sci STKE. 2002; May 7 (131):pe22.



83. THOMA KA. A contribution to the knowledge of the development of the submaxillary and sublingual salivary glands in human embryos. J Dent Res. 1919; 26: 95-143.
84. WHARTON TH. Adenografia, sive glandularum totius corporis descriptio. Citado por ARRAEZ AYBAR LA. en "Análisis morfo-diferenciativo del complejo epitelial submandibular". [Tesis Doctoral]. Madrid: Editorial Universidad Complutense; 1991.
85. TRIVIÑO A, HOZ R, SALAZAR J, RAMÍREZ A, ROJAS B, RAMÍREZ JM. Distribution and organization of the nerve fibre and ganglion cells of the human choroid. Anat Embryol. 2002; 205:417-430.
86. TUCKER AS. Salivary gland development. Semin Cell Dev Biol. 2007; 18: 237-244.
87. VELAZQUEZ SANTANA G. Morfogénesis de la glandula subman-dibular en el embrión humano. [Tesis Doctoral]. Madrid: 1952
88. YAMAMOTO S, FUKUMOTO E, YOSHIZAKI K, IWAMOTO T, YAMADA A, TANAKA K, SUZUKI H, AIZAWA S, ARAKAKI M, YUASA K, OKA K, CHAI Y, NONAKA K, FUKUMOTO S. Platelet-derived growth factor receptor regulates salivary gland morphogenesis via fibroblast growth factor expression. J Biol Chem. 2008; 22; 283(34):23139-49.
89. YOUNG JA, VON LENNEP EW. The morphology of salivary glands. London: Academic Press; 1978

